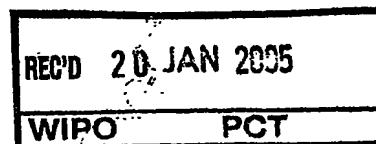


PCT IBOT/51447



# Ministero delle Attività Produttive

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*

*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

*Ufficio G2*

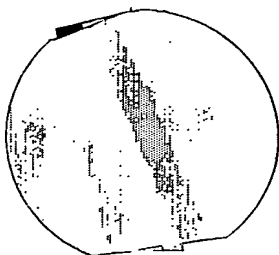


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. PZ 2003 A 000002.**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li..... 17 GEN. 2005

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (o)



IL FUNZIONARIO  
*Elena Marinelli*  
Sig.ra E. MARINELLI

# MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° PZ 2003 A000002

## A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	CAPUTO GIUSEPPE		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 CPTGPP64L09L873Q
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA PRINCIPE TOMMASO 21, 10125 TORINO		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			

## B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO

B0	D	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1	CAPUTO GIUSEPPE
INDIRIZZO	B2	VIA PRINCIPE TOMMASO 21
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	B3	10125 TORINO (TO)

## C. TITOLO

C1	COMPOSTI DEL TIPO CIANINA AVENTI UN BRACCIO DI TIPO ALCHINILICO
----	---

## D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	CAPUTO GIUSEPPE
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

## E. CLASSE PROPOSTA

## F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1	TIPO	F2
NUMERO DOMANDA	F3	DATA DEPOSITO	F4

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI

G1	
----	--

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I

*[Handwritten signature]*

# MODULO A (2/2)

## I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME;	I1	
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	
INDIRIZZO	I3	
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	I4	
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	

## M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE


TIPO DOCUMENTO	N. Es. ALL.	N. Es. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	2	0	50
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	0	0	0
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0	0	
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO	0	0	
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	0	0	

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	NO
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

ATTESTATI DI VERSAMENTO	(LIRE/EURO)	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	E A 0 SI	DUECENTONOVANTUNO/80
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO	D 0 F 0
DATA DI COMPILAZIONE	12/08/2003	

FIRMA DEL/DEI  
RICHIEDENTE/I

## VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	PZ 2003 A 000002	
C.C.I.A.A. DI	POTENZA	COD. 76
IN DATA	12-08-2003	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	0	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE		
IL DEPOSITANTE		L'UFFICIALE ROGANTE

**PROSPETTO MODULO A**  
**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

NUMERO DI DOMANDA:

P2 2003A 000002

DATA DI DEPOSITO:

12-08-2003

**A. RICHIEDENTE/I** COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

CAPUTO GIUSEPPE

VIA PRINCIPE TOMMASO 21, 10125 TORINO (TO), ITALIA

**C. TITOLO**

COMPOSTI DEL TIPO CIANINA AVENTI UN BRACCIO DI LEGAME ALCHINILICO

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

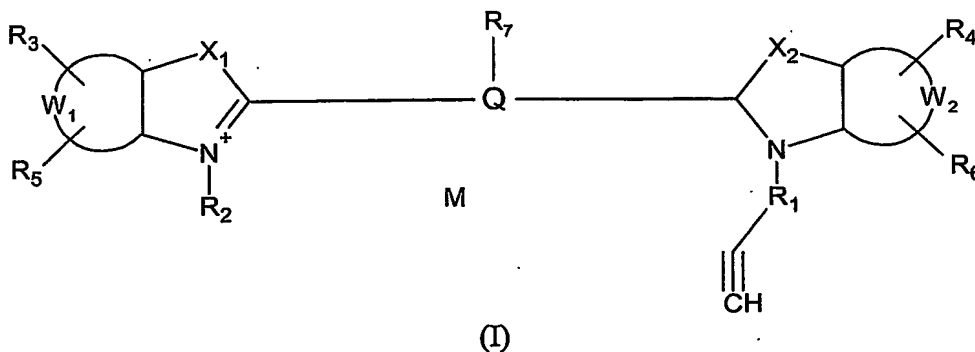
SOTTOGRUPPO

**E. CLASSE PROPOSTA**

**O. RIASSUNTO**

L'invenzione riguarda coloranti fluorescenti del tipo cianina modificati con un braccio di legame alchilico di formula (I), adatti per la coniugazione con biomolecole, quali ad esempio nucleosidi, nucleotidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, proteine, peptidi, vitamine ed ormoni. Sono anche descritti un procedimento e degli intermedi per la sintesi delle cianine alchiliche dell'invenzione, nonché coniugati cianina alchilica-biomolecola e loro procedimenti di preparazione. Le cianine alchiliche dell'invenzione possono essere vantaggiosamente utilizzate come marcatori di biomolecole o come quencher.

**P. DISEGNO PRINCIPALE**



FIRMA DEL / DEI  
RICHIEDENTE / I

*G. Caputo*



Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo: "Composti del tipo cianina aventi un braccio di legame alchilico"

Di: Caputo, Giuseppe, nazionalità italiana, via Principe Tommaso 21, 10125 Torino (Italia)

Inventore designato: Caputo, Giuseppe

Depositata il: 12 AGO. 2003

\* \* \* \*

### DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda coloranti fluorescenti del tipo cianina aventi un braccio di legame alchilico, la loro sintesi e il loro uso nella bioconiugazione e nella marcatura fluorescente di biomolecole, quali ad esempio nucleosidi, nucleotidi, acidi nucleici (DNA, RNA o PNA) e proteine, nonché il loro uso nella sintesi di coloranti fluorescenti ad ampio "Stokes shift".

In alcune forme di realizzazione, le cianine dell'invenzione sono inoltre adatte essere utilizzate per la doppia marcatura di acidi nucleici e proteine o altre biomolecole. In altre forme di realizzazione, le cianine dell'invenzione sono adatte ad essere utilizzate come "quencher", ossia molecole capaci di spegnere la fluorescenza emessa da fluorofori, da utilizzarsi in strutture del tipo "molecular beacon".

La tecnologia della marcatura fluorescente di biomolecole è molto utilizzata in settori quali la biologia molecolare, la genomica, la proteomica, la chimica analitica, poiché essa permette di realizzare test molto sensibili e specifici, competendo efficacemente con le tecniche di marcatura radioattiva ed enzimatica.

gc

Sonde di DNA marcate con coloranti fluorescenti si sono dimostrate reagenti preziosi per la separazione e l'analisi di molecole. Specifiche applicazioni di tali sonde fluorescenti includono ad esempio:

1. il sequenziamento automatico e la mappatura di DNA;
2. la determinazione della concentrazione di una sostanza che legghi una seconda specie, per esempio reazioni di ibridazione del DNA, in tecniche quali la PCR in tempo reale, la ibridazione in-situ e il riconoscimento molecolare tramite molecular beacon;
3. la localizzazione di biomolecole in cellule, in tessuti o in supporti insolubili per mezzo di tecniche quali la colorazione fluorescente.

Anche le proteine marcate con sostanze fluorescenti sono strumenti analitici molto potenti che trovano applicazione in tecniche quali la microscopia in fluorescenza, immunosaggi in fluorescenza, chip di proteine e l'elettroforesi capillare in fluorescenza indotta laser.

Recentemente si sono inoltre affermate tecniche per la rivelazione di acidi nucleici che fanno uso di sonde contenenti coppie di marcatori in cui uno è un emettitore di fluorescenza e l'altro è un quencher. Le due molecole sono per esempio coniugate alle due estremità di una sonda oligonucleotidica avente una sequenza centrale di legame all'acido nucleico bersaglio. La sonda oligonucleotidica assume una conformazione chiusa in virtù della presenza di due brevi sequenze di basi complementari l'una all'altra (generalmente di 5 a 10 basi ciascuna) che fiancheggiano la sequenza centrale di legame al bersaglio. Le due sequenze fiancheggianti in assenza di bersaglio sono capaci di dare origine a una struttura ibridata per appaiamento intramolecolare delle basi, nella quale il quencher si trova in

prossimità del fluoroforo, spegnendone in tal modo la fluorescenza. Quando la sonda oligonucleotidica trova una sequenza bersaglio complementare alla propria sequenza centrale di legame, essa si apre per ibridarsi con essa, e il fluoroforo ed il quencher si allontanano in modo tale che il quencher non possa più spegnere la fluorescenza emessa dal fluoroforo, permettendo quindi l'osservazione dell'emissione di fluorescenza in presenza del bersaglio.

Tra i coloranti fluorescenti le cianine trovano ampia applicazione come marcatori di biomolecole in diverse tecniche bioanalitiche grazie alle loro proprietà chimico-fisiche quali l'elevato coefficiente di estinzione, l'elevata resa quantica, l'indipendenza dal pH, il basso peso molecolare e la possibilità di effettuare saggi multipli con più fluorofori emettenti a diverse lunghezze d'onda, contemporaneamente utilizzati. Le cianine possono anche essere utilizzate come quencher se la loro struttura contiene per esempio dei nitrogruppi.

Per essere utile come marcatore fluorescente o come quencher nelle bioconiugazioni, la cianina deve essere provvista di un adatto braccio funzionalizzato per la formazione di un legame covalente con la biomolecola da marcare.

Mentre la parte cromogenica della cianina è generalmente nota, l'introduzione di un braccio di legame funzionalizzato per la coniugazione con la biomolecola rappresenta l'aspetto innovativo di molte invenzioni riguardanti l'uso di coloranti fluorescenti come reagenti di marcatura. La ricerca nel settore si è pertanto focalizzata sullo studio di bracci funzionalizzati innovativi, poiché la chimica ed il comportamento di tali

bracci funzionalizzati possono esercitare una notevole influenza sulla fluorescenza dell'intera molecola e su molte caratteristiche fisiche e chimiche quali l'idrofobicità/idrofilicità, l'aggregazione e lo spegnimento della fluorescenza per interazioni intramolecolari.

In generale è preferibile la presenza di un solo braccio di legame funzionalizzato sulla molecola di colorante fluorescente, per evitare problemi di legami incrociati fra più molecole uguali, di reticolazione, di reazioni multiple indesiderate o di purificazione.

La sintesi di biomolecole marcate con composti fluorescenti, ad esempio nucleotidi, richiede numerosi passaggi tra cui la sintesi separata di un nucleotide funzionalizzato e di una molecola fluorescente funzionalizzata e la loro successiva coniugazione.

Nella tecnica nota sono descritti diversi tipi di bracci di legame funzionalizzati adatti per la coniugazione di biomolecole con composti fluorescenti.

Ad esempio il brevetto US 5486616 descrive un metodo per marcare biomolecole con cianine solubili in acqua contenenti un braccio di legame funzionalizzato composto da una catena alchilica terminante con un gruppo funzionale scelto ad esempio fra isotiocianato, isocianato, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina mono o di alogeno sostituita, diazina mono o di alogeno sostituita, maleimide, aziridina, sulfonil cloruro, cloruro acilico, estere idrossisuccinimidico, estere idrossisulfosuccinimidico, estere imidico, idrazina, azidonitrofenile, azide, 3-(2-piridil ditio)propionamide, gliossale, aldeide.



gp



Ancora, il brevetto US 5047519 descrive un procedimento per preparare nucleotidi marcati con coloranti fluorescenti che comprende le seguenti fasi:

- attivazione del nucleotide alla sostituzione nucleofila aromatica mediante l'introduzione di un atomo di iodio nella posizione 5 di una pirimidina, nella posizione 8 di una purina o nella posizione 7 di una 7-deazapurina;
- fosforilazione dello idonucleotide per ottenere il corrispondente trifosfato;
- introduzione di un gruppo funzionale propargilammina nella posizione attivata per mezzo di un attacco nucleofilo secondo la reazione di Heck e catalisi con Pd(0);
- sintesi di un colorante fluorescente contenente un acido carbossilico;
- preparazione dell'estere attivo del colorante fluorescente per attivarlo verso la reazione di sostituzione nucleofila acilica;
- reazione fra il nucleotide modificato con il braccio propargilamminico con l'estere attivo del colorante fluorescente.

In alternativa, il braccio di legame funzionalizzato può contenere un gruppo acido, che deve poi essere attivato per reagire con un gruppo amminico sulla molecola di colorante a dare un legame ammidico.

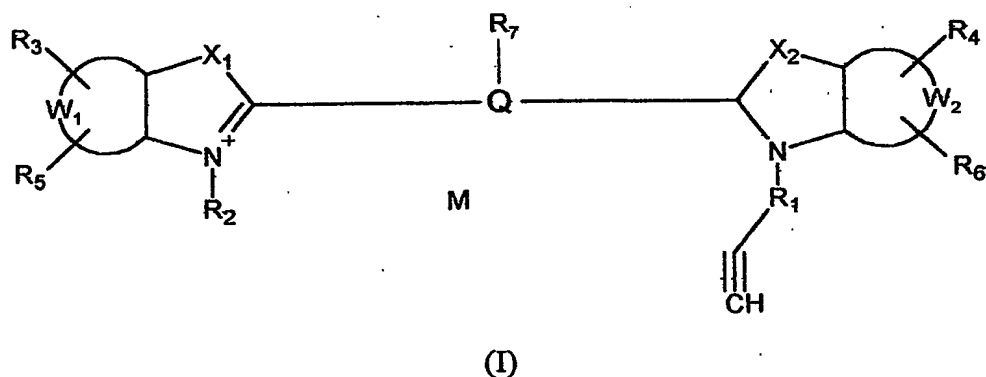
In entrambi i casi è comunque necessaria l'attivazione del gruppo acido carbossilico, ad esempio come estere attivo.

Tuttavia, l'utilizzo di esteri attivi, ed in generale di gruppi carbossilici attivi, presenta notevoli svantaggi come la scarsa stabilità nel tempo e difficoltà di sintesi. Gli esteri attivi infatti sono molecole poco stabili se non in condizioni perfettamente anidre e presentano quindi considerevoli problemi di conservazione. Essi tendono a degradarsi nel

tempo idrolizzandosi e la percentuale di prodotto attivo in una confezione diminuisce con il tempo. Inoltre, a causa della scarsa stabilità, è praticamente impossibile conservare ulteriormente il prodotto non utilizzato immediatamente dopo l'apertura della confezione. La necessità di operare sempre in condizioni perfettamente anidre rende inoltre la sintesi di tali composti particolarmente difficoltosa e costosa, essendo le purificazioni da condursi con eluenti anidri.

Scopo della presente invenzione è quindi quello di fornire una molecola di colorante fluorescente del tipo cianina provvista di un braccio di legame adatto per la coniugazione con biomolecole, quali ad esempio nucleosidi, nucleotidi, acidi nucleici e proteine, che tuttavia non richieda la formazione di un gruppo acido attivo durante la reazione di coniugazione.

Tale scopo è raggiunto da una cianina modificata con un braccio di legame alchililico avente la seguente formula generale (I), inclusi i suoi tautomeri di valenza:



*ff*

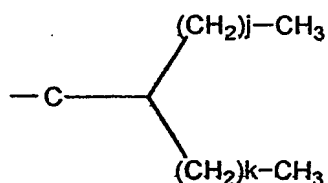
in cui:

$R_1$  è una catena alchilica lineare, satura o insatura, avente da 1 a 30 atomi di carbonio, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un componente indipendentemente scelto fra un atomo di ossigeno o di zolfo, un gruppo  $-NH-$  o  $-CONH-$ , o un raggruppamento ciclico di atomi di carbonio a 4, 5 o 6 membri, aromatico o non aromatico,

in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un eteroatomo indipendentemente scelto fra ossigeno, zolfo, azoto e selenio;

$W_1$  e  $W_2$  sono indipendentemente scelti tra un anello benzenico e un anello naftalenico, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti da uno o più eteroatomi scelti fra ossigeno, zolfo, selenio e azoto, oppure uno tra  $W_1$  e  $W_2$  è assente, oppure entrambi sono assenti;

$X_1$  e  $X_2$  sono indipendentemente scelti nel gruppo che consiste di  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-Se-$ ,  $-N-$ ,  $-C(CH_3)_2$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-NH-$ , o



con  $j=1-20$  e  $k=1-20$ ;

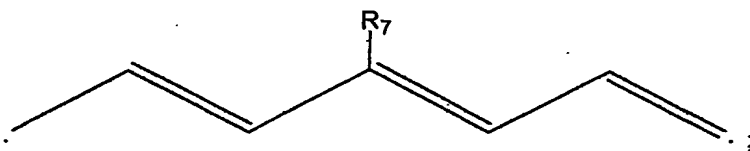
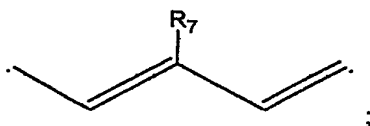
$R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  ed  $R_6$  sono indipendentemente scelti fra idrogeno,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-NO_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3^-$ , e  $-R_8-Y$  in cui  $R_8$  è una catena alchilica lineare, satura o insatura, avente da 1 a 30 atomi di carbonio, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un componente indipendentemente scelto fra un atomo di ossigeno o zolfo, un

*gc*

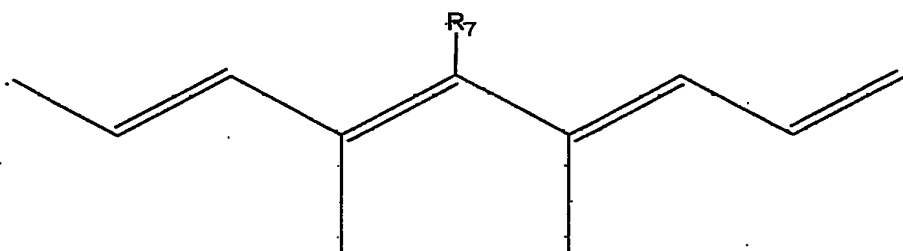
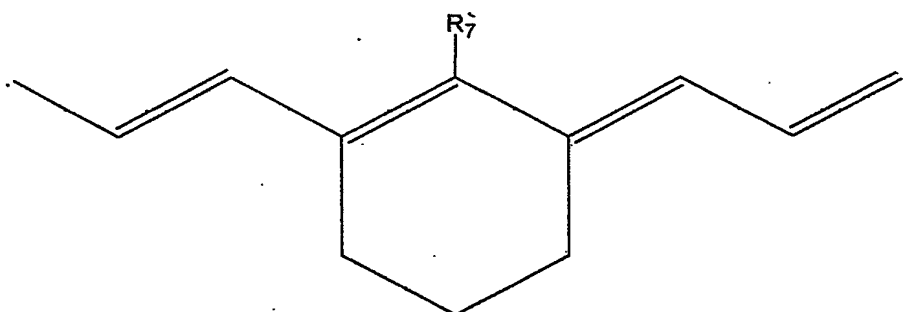
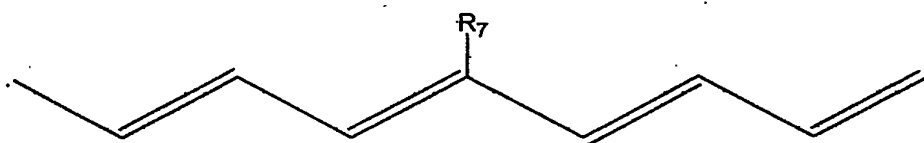
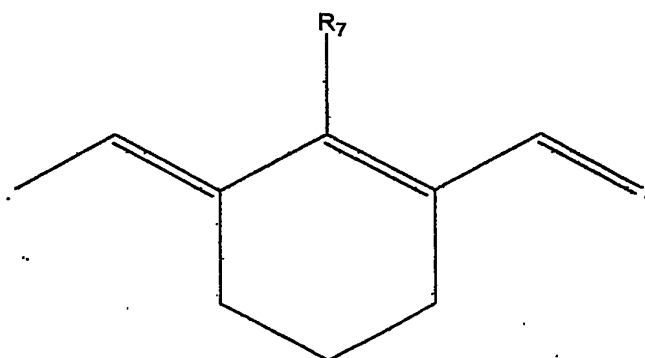
gruppo -NH- o -CONH, o un raggruppamento ciclico di atomi di carbonio a 4, 5 o 6 membri, aromatico o non aromatico, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un eteroatomo indipendentemente scelto fra ossigeno, zolfo, azoto o selenio ed in cui Y è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, carbossile, carbonile, ammino, sulfidril, tiocianato, isotiocianato, isocianato, maleimide, ossidril, fosforamidito, glicidil, imidazolil, carbamoil, anidril, bromoacetamido, cloroacetamido, iodoacetamido, solfonil alogenuro, alogenuro acilico, alogenuro arilico, idrazide, estere succinimidilico, estere idrossisolfosuccinimidico, estere ftalimidico, estere naftalimidico, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina mono- o di- alogeno sostituita, diazina mono- o di- alogeno sostituita, aziridina, estere imidico, idrazina, azidonitrofenil, azide, 3-(2-piridilditio)-propionamide, gliossale, aldeide, nitrofenil, dinitrofenil, trinitrofenil e  $-C\equiv CH$ ;

M è un controione; e

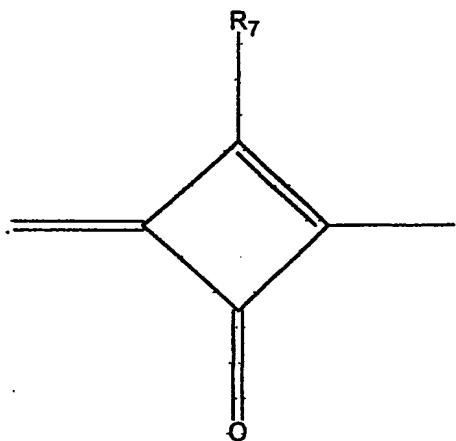
Q è una catena polimetinica scelta fra



*gl*



*Handwritten signature or mark.*



in cui  $R_7$  è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, fluoro, cloro, bromo, iodio, fenossi, tiofenossi, anilino, cicloesilamino, piridina,  $-R_8-Y$ ,  $-O-R_8-Y$ ,  $-S-R_8-Y$ ,  $-NH-R_8-Y$ , in cui  $R_8$  e  $Y$  sono come definiti in precedenza, e arile eventualmente sostituito con uno o più sostituenti scelti indipendentemente nel gruppo che consiste di  $-SO_3H$ , carbossile ( $-COOH$ ), ammino ( $-NH_2$ ), carbonile ( $-CHO$ ), tiocianato ( $-SCN$ ), isotiocianato ( $-CNS$ ), epossidi e  $-COZ$  dove  $Z$  rappresenta un gruppo uscente.

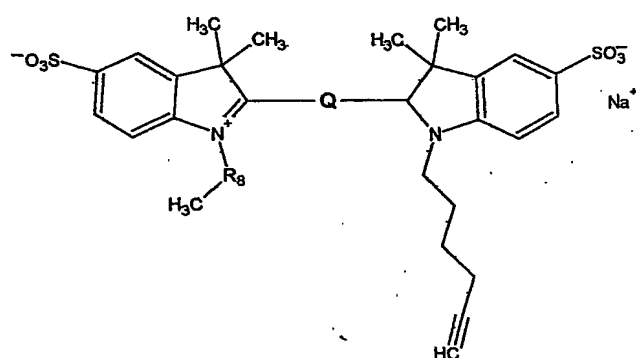
Adatti gruppi uscenti sono ad esempio  $-Cl$ ,  $-Br$ ,  $-I$ ,  $-OH$ ,  $-OR_{11}$ ,  $-OCOR_{11}$ , in cui  $R_{11}$  è alchile inferiore  $C_1-C_4$  lineare o ramificato (ad esempio metile, etile, *t*-butile o *i*-propile),  $-O-CO-Ar$ , in cui  $Ar$  è arile eventualmente sostituito,  $-O-CO-Het$ , in cui  $Het$  è scelto tra succinimide, sulfosuccinimide, ftalimide e naftalimide,  $-NR_{22}R_{33}$ , in cui  $R_{22}$  e  $R_{33}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile  $C_1-C_{10}$  lineare o ramificato.

Come sopra utilizzata, l'espressione "atomo di carbonio eventualmente sostituito" indica che tale atomo di carbonio nella catena alchilica lineare o nel raggruppamento ciclico di atomi può essere rimpiazzato da uno dei componenti o eteroatomi sopra indicati.

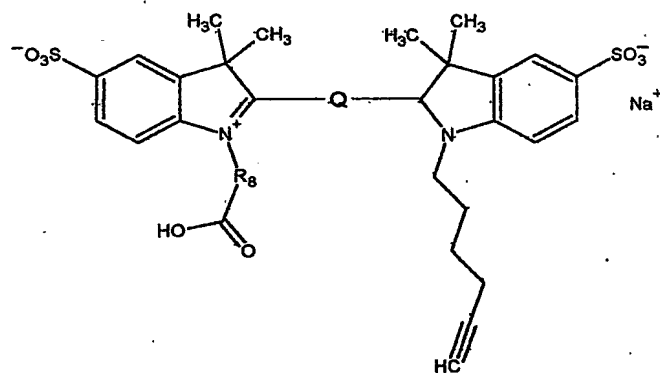
*gc*

Nel proseguo della descrizione, le cianine aventi un braccio di legame alchinilico della presente invenzione illustrate dalla formula (I) saranno indicate come "cianine alchiniliche".

Esempi preferiti di cianine alchiniliche che rientrano nell'ambito della presente invenzione sono:

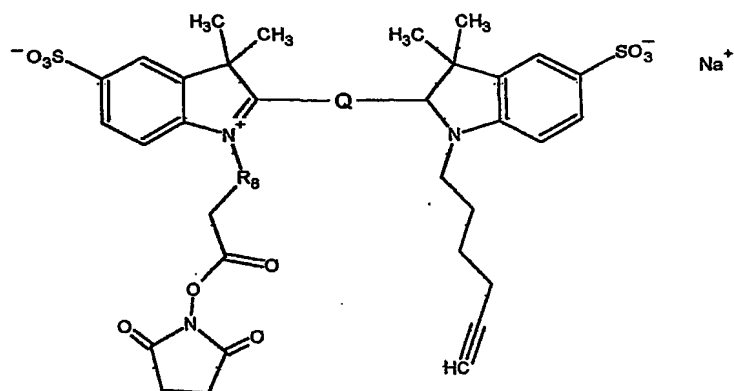


Formula (Ia)

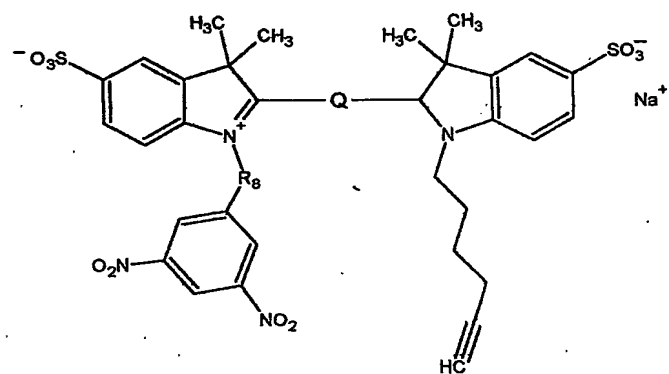


Formula (Ib)

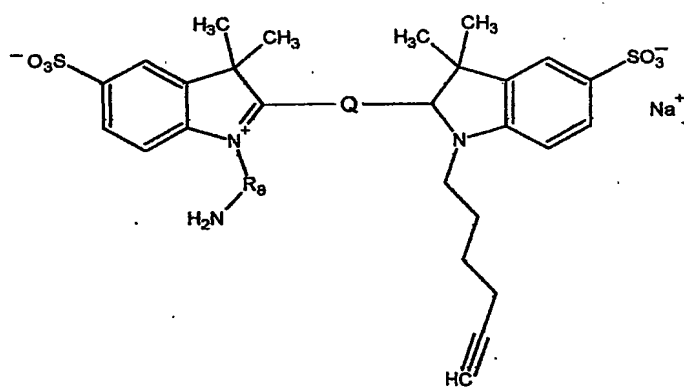
*cc*



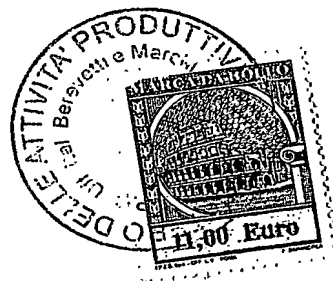
Formula (Ic)



Formula (Id)

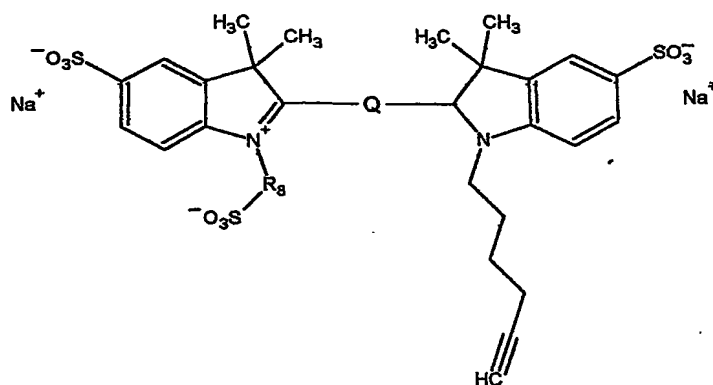


Formula (Ie)

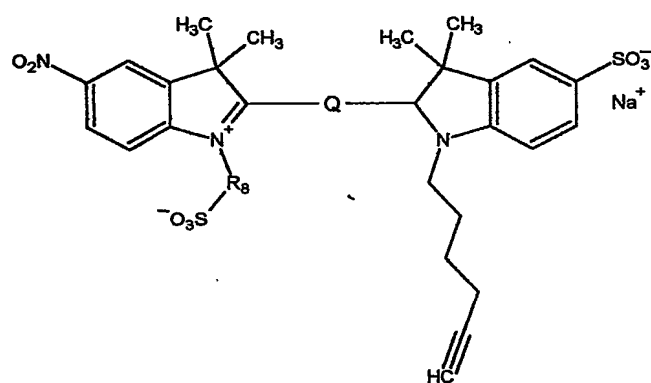


4

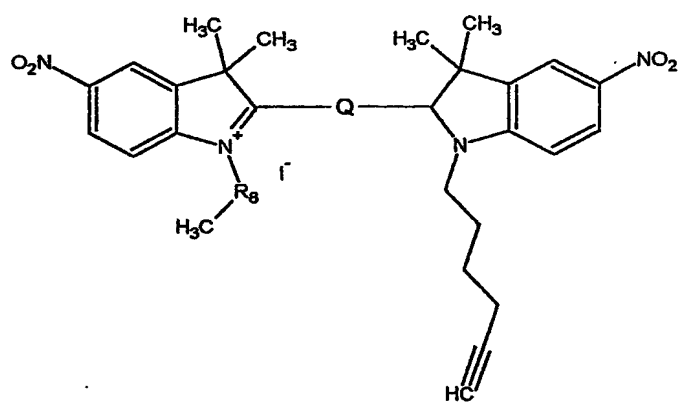




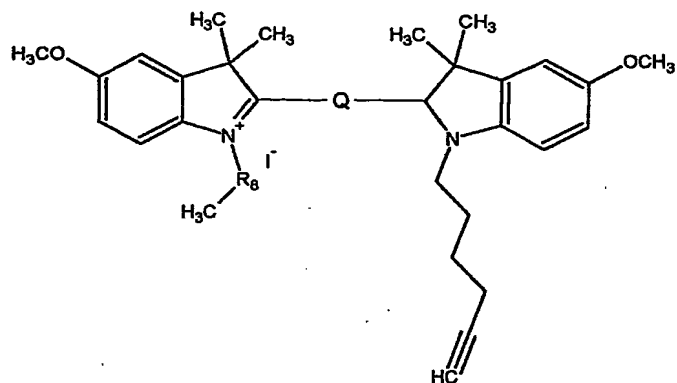
Formula (If)



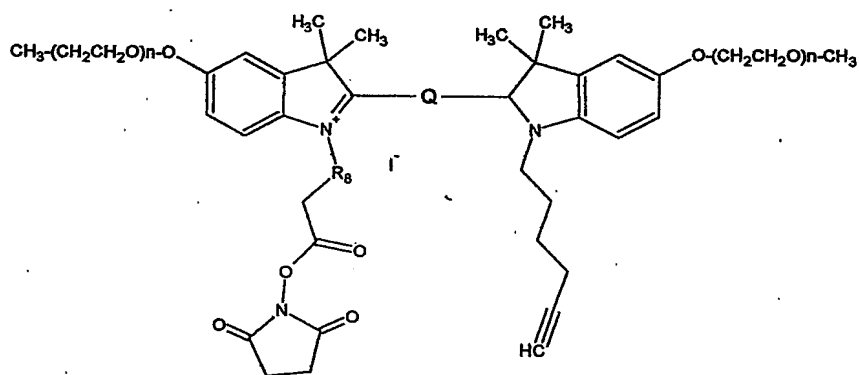
Formula (Ig)



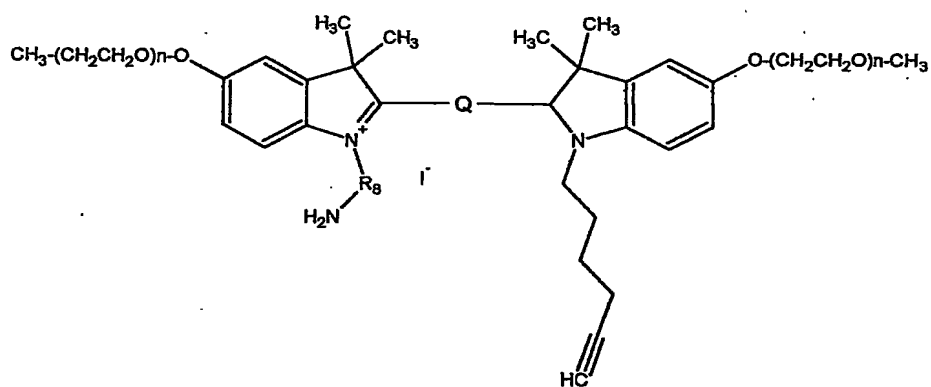
Formula (Ih)



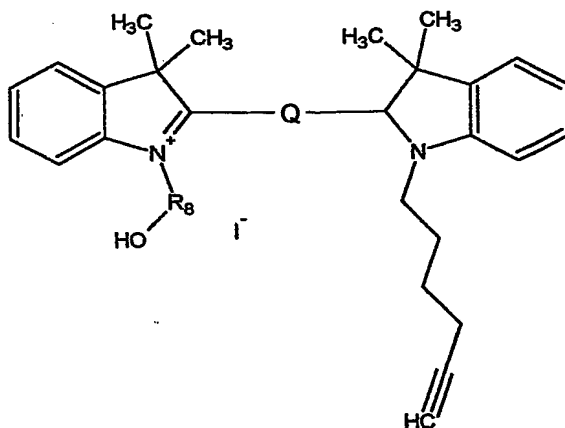
Formula (Ii)



Formula (II)



Formula (Im)



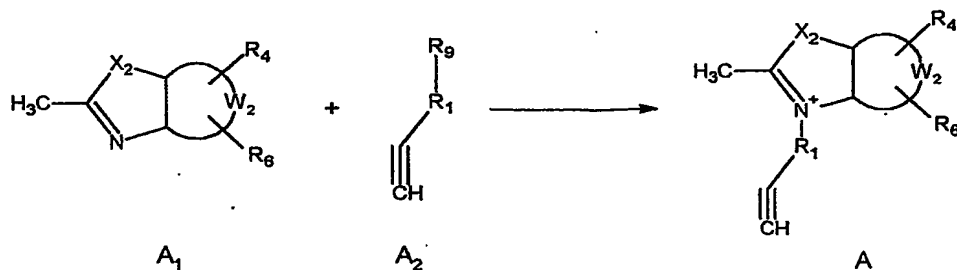
Formula (In)

in cui Q ed  $R_8$  sono come definiti sopra per la formula (I) ed  $n$  è un numero intero compreso tra 1 e 100.

Le cianine alchiniliche della presente invenzione sono sintetizzate secondo uno schema di reazione che comprende le seguenti fasi:

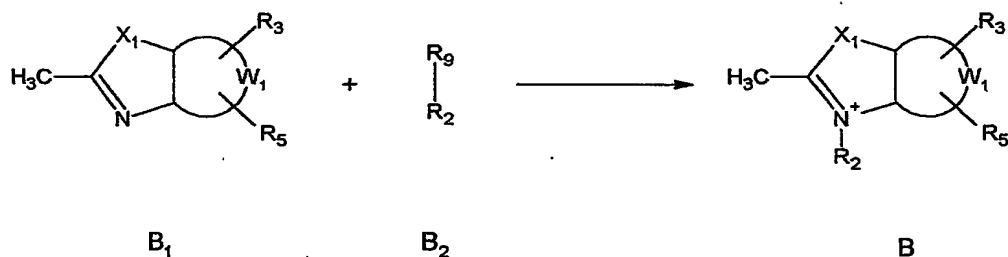
1. sintesi del sale di ammonio quaternario alchinilico
2. sintesi di un secondo sale di ammonio quaternario
3. sintesi dell'emicianina
4. sintesi della cianina

La fase 1 è condotta facendo reagire in un adatto solvente, ad esempio solfolano, acetonitrile o N,N-dimetilformammide, un sistema eterociclico azotato con una molecola contenente un triplo legame terminale per formare il sale di ammonio quaternario alchinilico:



in cui  $X_2$ ,  $R_1$ ,  $R_4$ ,  $R_6$  e  $W_2$  sono come definiti per la formula (I), e  $R_9$  è scelto nel gruppo che consiste di iodio, cloro, bromo, OH, solfato e tosilato.

La fase 2 consiste nella sintesi di un secondo sale di ammonio quaternario a partire da un secondo sistema eterociclico azotato e da una molecola alchilante  $R_2$ — $R_9$  secondo lo schema:



in cui  $X_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  e  $W_1$  sono come definiti per la formula (I), e  $R_9$  è scelto nel gruppo costituito da iodio, cloro, bromo, OH, solfato, tosilato.

La fase 3 può essere condotta sia sul sale di ammonio quaternario alchinilico A sintetizzato nella fase 1 sia sul sale di ammonio quaternario B sintetizzato nella fase 2. Essa consiste nella reazione di A o B con un composto capace di reagire con il sale di ammonio quaternario eterociclico e generare una catena polimetinica. Esempi non limitativi di tali composti sono il trietilortoformiato, la N,N-difenilformammide, la malonaldeide



dianilide, la piridilmalonaldeide, il trimetossipropene, il cloruro di pentamidinio, la cloromalonaldeide dianilide e l'acido squarico. Da questo passaggio si ottiene un intermedio detto emicianina.

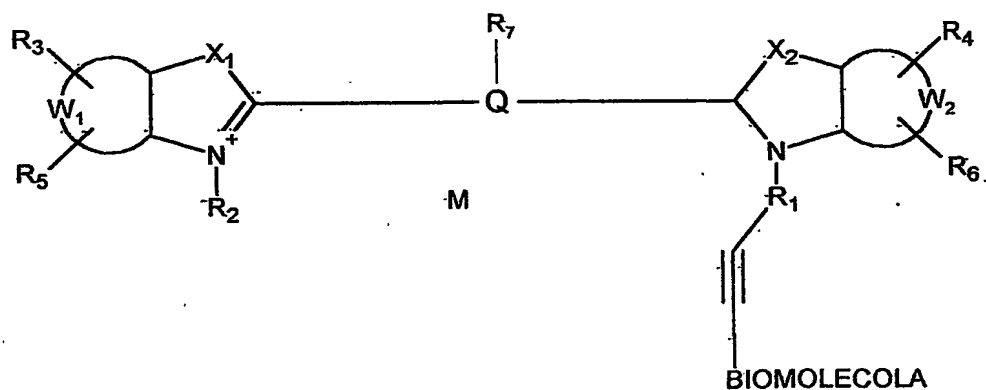
La fase 4 è condotta facendo reagire l'emicianina ottenuta nella fase 3 con il sale di ammonio quaternario eterociclico A o B non utilizzato nella fase precedente. Si ottiene come prodotto la cianina alchinilica desiderata.

In tutte le fasi precedenti le particolari condizioni di reazione dipendono dalle tipologie di reagenti utilizzati nei diversi passaggi e dal prodotto finale desiderato.

Le cianine alchiniliche della presente invenzione sono particolarmente adatte per la coniugazione di biomolecole, in particolare proteine, nucleosidi, nucleotidi, oligonucleotidi e in generale acidi nucleici che contengano basi modificate con un atomo di alogeno (per esempio iodio, cloro, bromo) nella posizione 5 delle pirimidine, 8 delle purine e 7 delle 7-deazapurine.

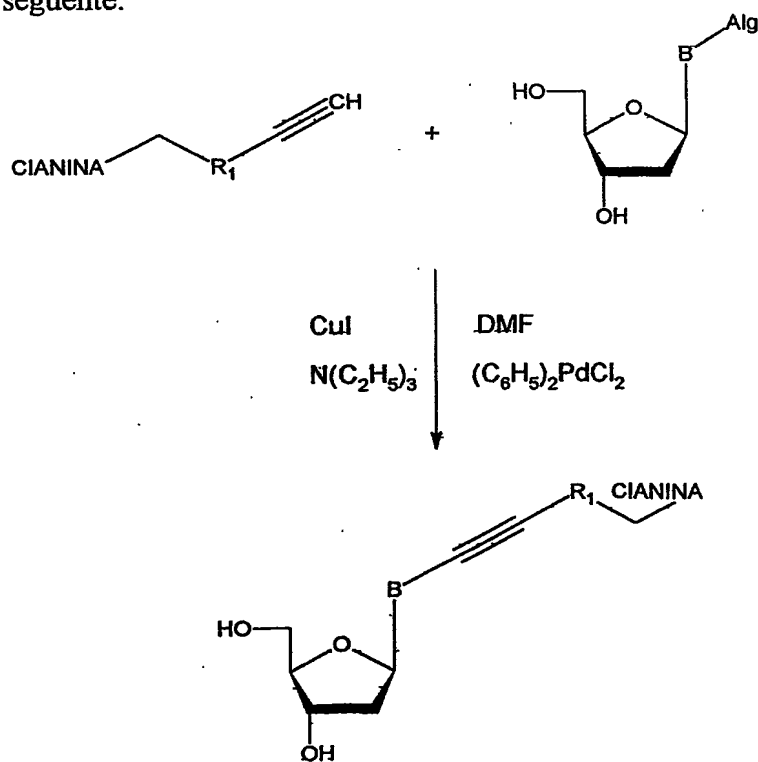
Nell'ambito della presente invenzione rientra pertanto anche una cianina alchinilica come descritta in precedenza coniugata, attraverso il braccio di legame  $R_1-C\equiv CH$ , con una biomolecola scelta dal gruppo che consiste di nucleosidi, nucleotidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, ad esempio DNA, RNA o PNA ("peptide nucleic acid"), peptidi e proteine.

Tale cianina coniugata con una biomolecola può essere rappresentata dalla seguente formula generale (II):



in cui  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, X_1, X_2, W_1, W_2, M$  e  $Q$  sono come definiti per la formula (I).

Con riferimento ai nucleosidi, lo schema generale della coniugazione è il seguente:



*gc*

in cui B è una base scelta tra citosina, uracile, guanina, adenina, xantina, ipoxantina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-deazaxantina, 7-deazaipoxantina, Alg è un alogeno scelto fra iodio, cloro e bromo, e in cui  $R_1$  è come definito per la formula (I).

Nello Schema 1 precedente, la cianina contenente il braccio alchilico secondo l'invenzione è fatta reagire con l'alogeno-derivato di un nucleoside. Alogeno-derivati di nucleosidi e nucleotidi sono disponibili in commercio oppure possono essere sintetizzati come descritto nel brevetto europeo EP0251786B1.

La reazione è condotta in un adatto solvente organico anidro, ad esempio N,N-dimetilformamide (DMF) anidra, ed in presenza di una base organica, quale ad esempio trietilammina ( $N(C_2H_5)_3$ ), e di un composto di Pd(0) come catalizzatore. In alternativa al composto di Pd(0) è possibile utilizzare come catalizzatore un composto di Pd(II) (ad esempio  $(C_6H_5)_2PdCl_2$ ) e un cocatalizzatore capace di formare Pd(0) in situ, come ad esempio CuI.

La reazione è preferibilmente condotta a temperatura ambiente e per un tempo di circa 8 ore. Trascorso il tempo di reazione, alla miscela di reazione viene aggiunta una seconda aliquota di catalizzatore, base organica ed eventualmente cocatalizzatore, poi la miscela è lasciata reagire nelle medesime condizioni per un tempo ulteriore, preferibilmente circa 16 ore.

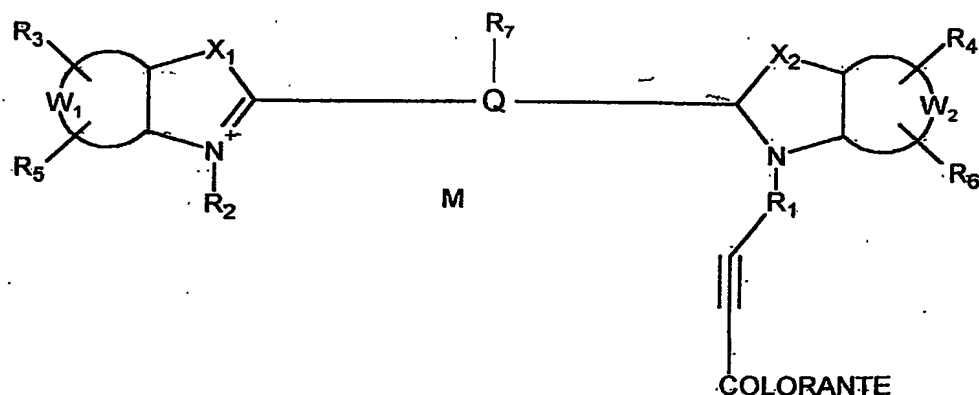
Lo Schema 1 di reazione si applica anche alla reazione di coniugazione di nucleotidi, oligonucleotidi e acidi nucleici (DNA, RNA, PNA).

In alternativa, il coniugato cianina-nucleoside ottenuto secondo lo Schema 1 può essere fosforilato ottenendo un coniugato cianina-nucleotide trifosfato. La fosforilazione del coniugato cianina-nucleoside può essere condotta ad esempio utilizzando il procedimento di fosforilazione di nucleosidi descritto nel brevetto EP0251786B1.

Il coniugato cianina-nucleotide trifosfato è un adatto substrato per la DNA polimerasi e può essere utilizzato nelle reazioni di PCR per la preparazione di catene di DNA fluorescenti.

Nell'ambito della presente invenzione rientra anche una cianina alchinilica come descritta in precedenza coniugata, attraverso il braccio di legame  $R_1-C\equiv CH$ , con un secondo colorante fluorescente, il secondo colorante fluorescente essendo in grado di emettere fluorescenza a lunghezze d'onda a cui la cianina alchinilica è in grado di assorbire, oppure il colorante fluorescente essendo in grado di assorbire a lunghezze d'onda a cui la cianina alchinilica è in grado di emettere (coppie FRET).

Tale cianina coniugata con un secondo colorante può essere rappresentata dalla seguente formula generale (III):



*GC*

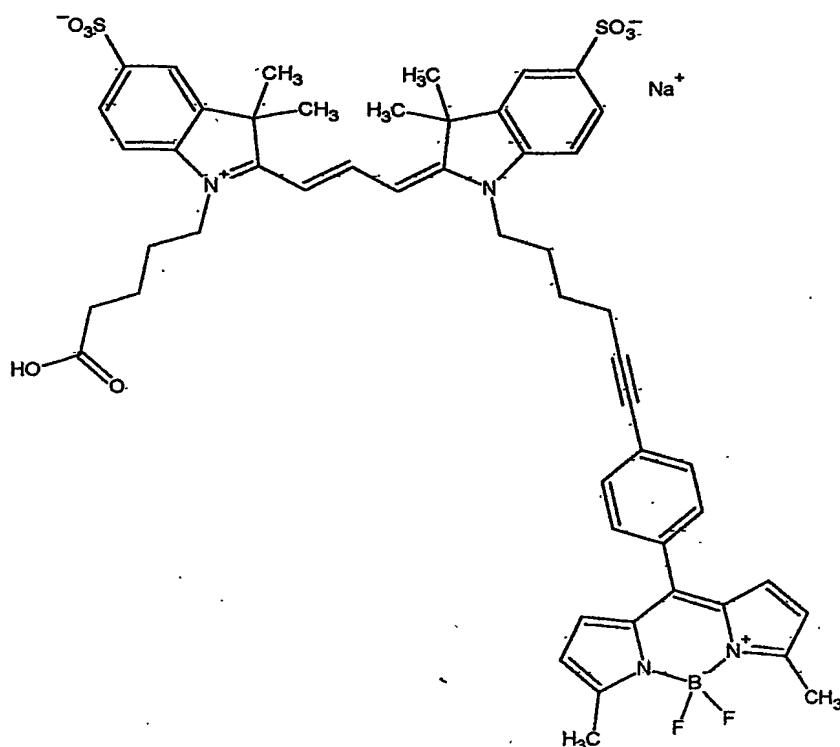


in cui  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, X_1, X_2, W_1, W_2, M$  e  $Q$  sono come definiti sopra per la formula (I) e COLORANTE è il secondo colorante.

Tali coniugati sono utili quando si desidera avere un sistema fluorescente con uno Stokes shift ampio per avere la massima separazione fra la luce di eccitazione e l'emissione.

La strumentazione bioanalitica ottica utilizza infatti dei filtri per separare ottimamente la luce eccitante dall'emissione, ma nel caso di fluorofori con Stokes shift piccolo possono esserci delle sovrapposizioni che rendono difficile la quantificazione della fluorescenza emessa.

Un esempio di coniugato fra una cianina e un secondo colorante fluorescente che forma un fluoroforo ad ampio Stokes shift è il composto 1-(4-carbossibutil)-1'-{6-[N,N'-Difluoroboril-1,9-dimetil-5-(4-iodofenil)-dipirril]-es-5-inil}-3,3,3',3'-tetrametil-5,5'-disulfo indodicarbocianina sale di sodio di formula:



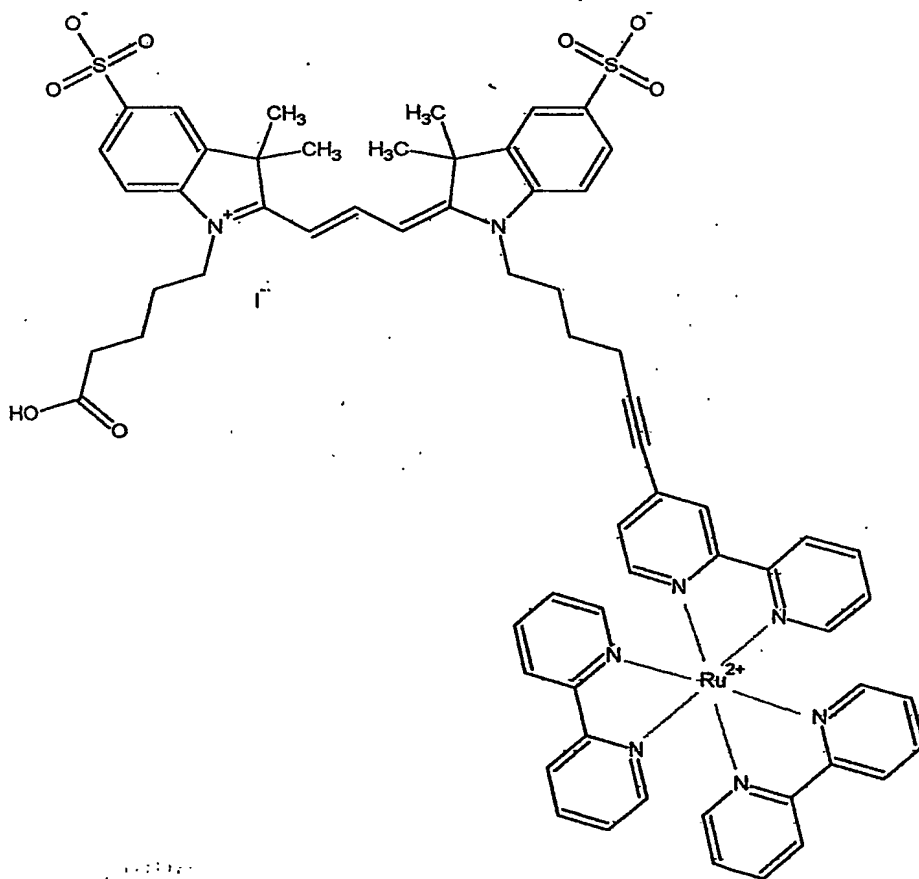
Formula (IIIa)

che è ottenuto facendo reagire la 1-(4-carbossibutil)-1'-es-5-inil-3,3,3',3'-tetrametil-5,5'-disolfonato indodicarbocianina sale di sodio con la N,N'-difluoroboril-1,9-dimetil-5-(4-iodofenil)-dipirrina secondo un meccanismo analogo a quello descritto per la coniugazione di una cianina alchinilica con un alogeno-nucleoside.

Altri esempi sono coniugati ottenuti facendo reagire cianine alchiniliche di formula generale (I) con complessi di metalli di transizione (Me), quali rutenio, osmio, renio, iridio, rodio, platino, palladio, molibdeno e tecnezio, aventi almeno un legante eterociclico azotato legato al braccio di legame alchinilico della cianina. Leganti eterociclici azotati adatti a tale

scopo sono ad esempio 2,2'-bipiridina eventualmente sostituita, 1,10-fenantrolina eventualmente sostituita, batofenantrolina eventualmente sostituita. Adatti sostituenti per i leganti eterociclici azotati sopra menzionati sono ad esempio iodio, cloro, bromo, fenile, trifluorometile, oppure il gruppo  $R_5$  definito nella formula (I).

Un esempio specifico non limitativo di un tale coniugato è il composto 1-(4-carbossibutil)-1'-{6-[(2,2'-bipiridina)<sub>2</sub>(2,2'-bipiridin-4-il)rutenio(II)]-es-5-inil}-3,3,3',3'-tetrametil-5,5'-disolfonato indodicarbocianina ioduro:



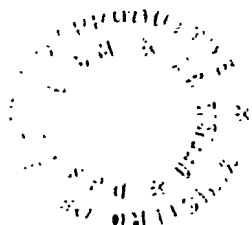
Tale composto è sintetizzato facendo reagire la cianina alchinilica secondo la presente invenzione 1-(4-carbossibutil)-1'-es-5-inil-3,3,3',3'-tetrametil-5,5'-disolfonato indodicarbocianina sale di sodio con il composto bis(2,2'-bipiridina) (4-iodo-2,2',bipiridina) Rutenio(II) con una procedura analoga a quella dello Schema 1 in cui l'alogeno-nucleoside è sostituito dal complesso di rutenio.

Un composto di questo tipo ha proprietà ottiche molto interessanti che lo rendono particolarmente utile come tracciante in applicazioni bioanalitiche.

Ulteriori forme di realizzazione preferite della presente invenzione sono le cianine alchiniliche illustrate nella formula (I) in cui uno tra  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  ed  $R_6$  è  $-R_8-Y$  in cui  $Y$  è diverso da  $H$  e da  $-C\equiv CH$ . Tali cianine contengono infatti un secondo gruppo funzionale in grado di legare una seconda biomolecola, ad esempio una proteina o un peptide.

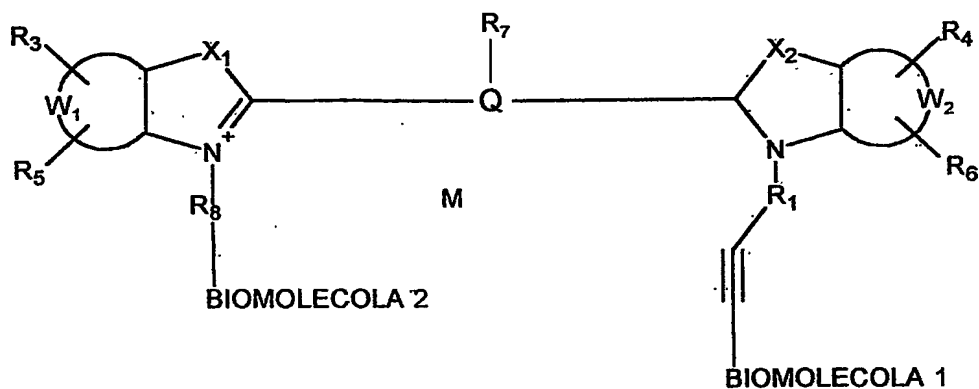
Le cianine secondo tale forma di realizzazione preferita sono molecole bifunzionali che permettono quindi di coniugare contemporaneamente due biomolecole, uguali o differenti.

Nell'ambito della presente invenzione rientra quindi una cianina alchinilica bifunzionale coniugata attraverso il braccio di legame  $-R_1-C\equiv CH$  con una prima biomolecola scelta dal gruppo che consiste di nucleotidi, nucleosidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, proteine, peptidi, vitamine ed ormoni e attraverso il braccio di legame  $-R_8-Y$  con una seconda biomolecola uguale o differente scelta dal gruppo che consiste di nucleotidi, nucleosidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, proteine, peptidi, vitamine ed ormoni.



gl

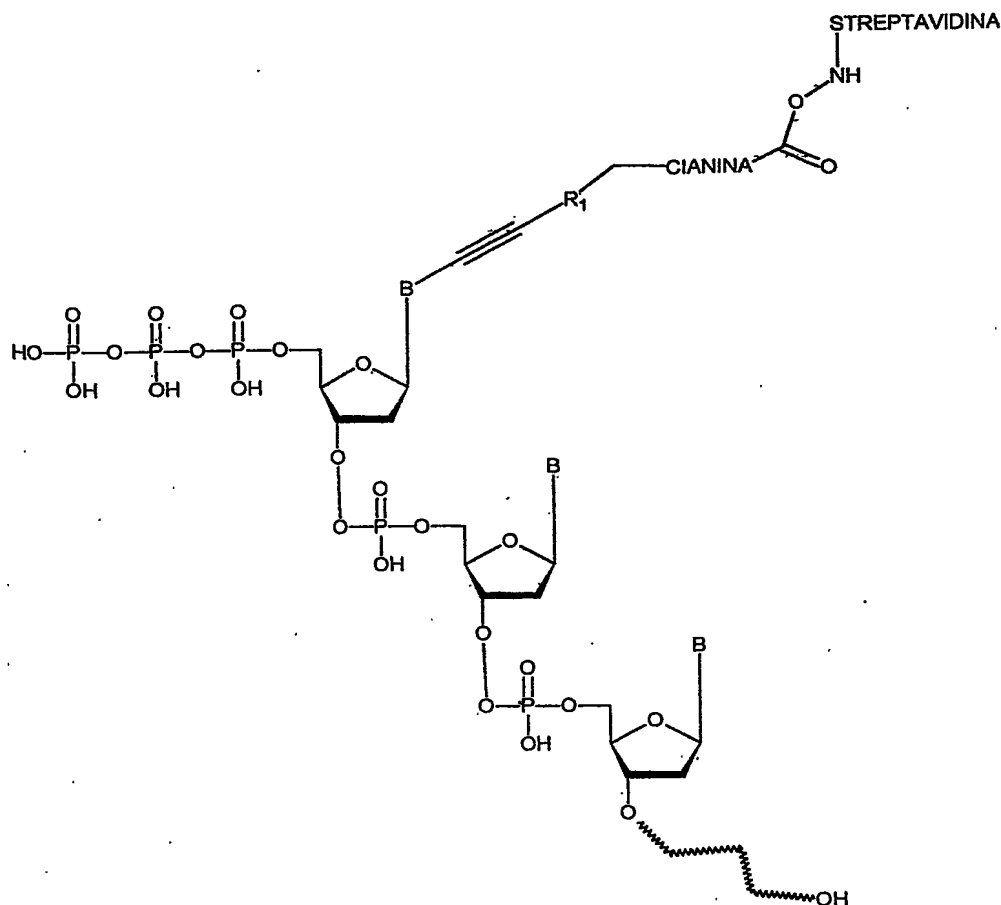
Tale cianina alchilica bifunzionale coniugata con una prima e una seconda biomolecola è rappresentata dalla seguente formula generale (IV):



(IV)

in cui  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $M$  e  $Q$  sono come definiti per la formula (I).

Le cianine alchiliche bifunzionali dell'invenzione possono essere per esempio utilizzate per preparare oligonucleotidi fluorescenti coniugati con la proteina streptavidina, utili per l'impiego in saggi di riconoscimento molecolare con amplificazione del segnale. La streptavidina può infatti legare con un'affinità molto alta quattro molecole di biotina. Se ogni biotina viene coniugata a sua volta con una cianina fluorescente, il segnale fluorescente complessivo rilevabile è cinque volte maggiore, con un notevole aumento della sensibilità del saggio. Il seguente schema mostra la struttura del bioconiugato descritto sopra.



Gli esempi che seguono, che illustrano la sintesi di alcune forme di realizzazione della presente invenzione, sono forniti a scopo puramente illustrativo e non devono essere intesi a limitare in alcun modo la portata dell'invenzione.

**Esempio 1. Sintesi di 1-etil-1'-es-5-inil-3,3',3'-tetrametil-5,5'-disulfonato-indomonocarbocianina sale di potassio (cianina IRIS 3 sulfo alchinil) (Composto 1)**

**a) Sintesi di 6-iodo-es-1-ino**

Una miscela di 6-cloro-es-1-ino (10 g, 85.8 mmol) e 71 mL di acetone anidro è riscaldata a 70°C in un bagno d'acqua per 10 min in un pallone

sormontato da un condensatore a riflusso chiuso da una trappola di cloruro di calcio. Si aggiunge ioduro di sodio (25,8 g, 172 mmol) alla miscela e il riscaldamento è mantenuto per 22-24 h. La miscela è quindi raffreddata a temperatura ambiente e concentrata per distillazione. Si aggiunge etere e si filtra il sale inorganico che precipita. Il filtrato è versato in un imbutto separatore e successivamente agitato con una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio al 10% di sodio bisolfito. Si secca con solfato di sodio anidro e si rotoevapora il solvente a pressione ridotta.

**b) Sintesi di N-es-5-il-2,3,3-trimetilindoleninio-5-solfonato**

Una miscela di 2,3,3-trimetil-3H-indolenina-5-solfonato di potassio (5,0 g, 18,2 mmol), 6-iodo-es-1-ino (22,56 g, 180,2 mmol) e 50 mL di sulfolano è collocata in un pallone sormontato da un condensatore a riflusso e riflussata a 120°C su un bagno d'acqua per 12 h. La miscela di reazione è raffreddata a temperatura ambiente e addizionata goccia a goccia a 800 mL di etere dietilico agitato vigorosamente. Il prodotto è raccolto su un filtro di vetro sinterizzato, lavato con etere e seccato sotto vuoto in un essiccatore.

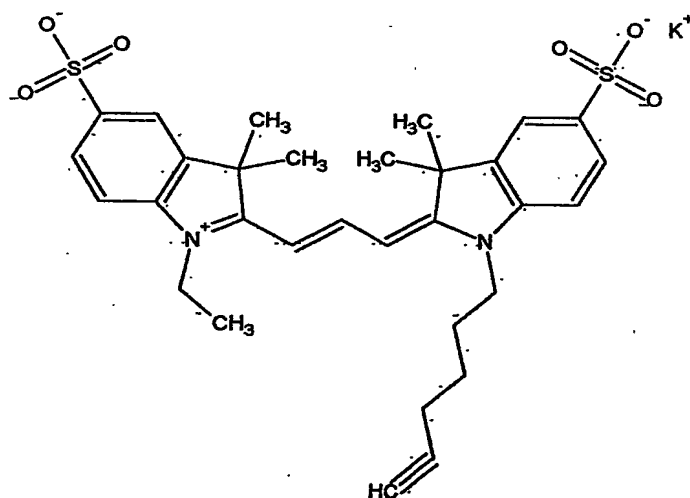
**c) Sintesi di 2-{(E)-2[acetil(fenil)amino]vinil}-1-etil-3,3-dimetil-3H-indolio-5-solfonato di potassio (emicianina)**

In un pallone da 250 mL si collocano 3,0 g (8,43 mmol) di N-etil-2,3,3-trimetilindoleninio-5-solfonato, 3,33 g (16,98 mmol) di N,N-difenilformamide, 6,0 mL di cloruro di acetile e 60,0 mL di anidride acetica. La miscela è riscaldata a 120 °C per 90 minuti. La soluzione arancione è raffreddata fino a temperatura ambiente e addizionata goccia a goccia a 300 mL di etere dietilico agitato vigorosamente. Il prodotto è raccolto su un filtro di vetro sinterizzato, lavato con etere dietilico ed essiccato sotto vuoto

in un essiccatore. Il prodotto desiderato ha un massimo di assorbanza in metanolo a 378 nm. La resa è del 97 %.

**d) sintesi della cianina IRIS 3 sulfo alchinil**

5,0 g (12,14 mmol) dell'emicianina sintetizzata nel passaggio precedente è collocata in un pallone da 250 mL insieme a 3,87 g (12,14 mmol) di N-es-5-inil-2,3,3-trimetilindoleninio-5-solfonato, 10,80 mL di trietilammina e 109 mL di anidride acetica, e riscaldata a 135 °C per 2 h. La soluzione rosso porpora è raffreddata fino a temperatura ambiente e addizionata goccia a goccia a 800 mL di etere dietilico agitato vigorosamente. Il prodotto desiderato è raccolto su un filtro di vetro sinterizzato, lavato con etere dietilico ed essiccato sotto vuoto in un essiccatore. Il prodotto è quindi purificato per cromatografia flash utilizzando un gradiente di una miscela diclorometano/metanolo da 90/10 a 70/30. La resa è del 42 %. Il prodotto ha il massimo di assorbanza in etanolo a 554 nm e il massimo di emissione a 570 nm.



Composto 1



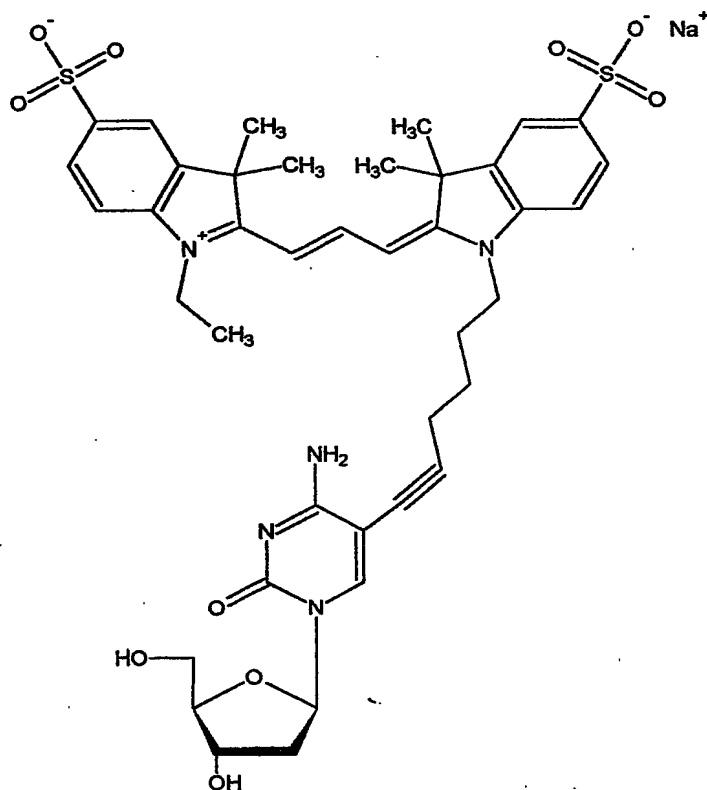


**Esempio 2: Sintesi di 5-(cianina IRIS 3' sulfo alchinil)-2'-deossicitidina (Composto 2)**

Si collocano 15,6 mg (0,044 mmol) di 5-iodo-2'-deossicitidina e 1,7 mg (0,0088 mmol) di CuI in un vial munito di ancoretta magnetica; si aggiungono 83,2 mg (0,131 mmol) di Composto 1 sciolto nella minima quantità di N,N-dimetilformamide anidra. Si fa riflussare argon per quindici minuti. Si aggiungono 0,012 mL (0,0088 mmol) di  $N(C_2H_5)_3$  e 3,0 mg (0,0044 mmol) di  $(C_6H_5)_2PdCl_2$  e si fa riflussare argon per altri quindici minuti. Si lascia reagire sotto agitazione a temperatura ambiente per otto ore. Passato il tempo si aggiungono ancora 1,7 mg (0,0088 mmol) di CuI, 0,012 mL di  $N(C_2H_5)_3$  e 3,0 mg (0,0044 mmol) di  $(C_6H_5)_2PdCl_2$  e si lascia reagire sempre nelle stesse condizioni per altre 16 ore. Si effettua una purificazione su colonna MPLC (eluenti:  $CH_3OH$ ,  $H_2O$ ).

Il prodotto si presenta come un solido polverulento di colore rosso.



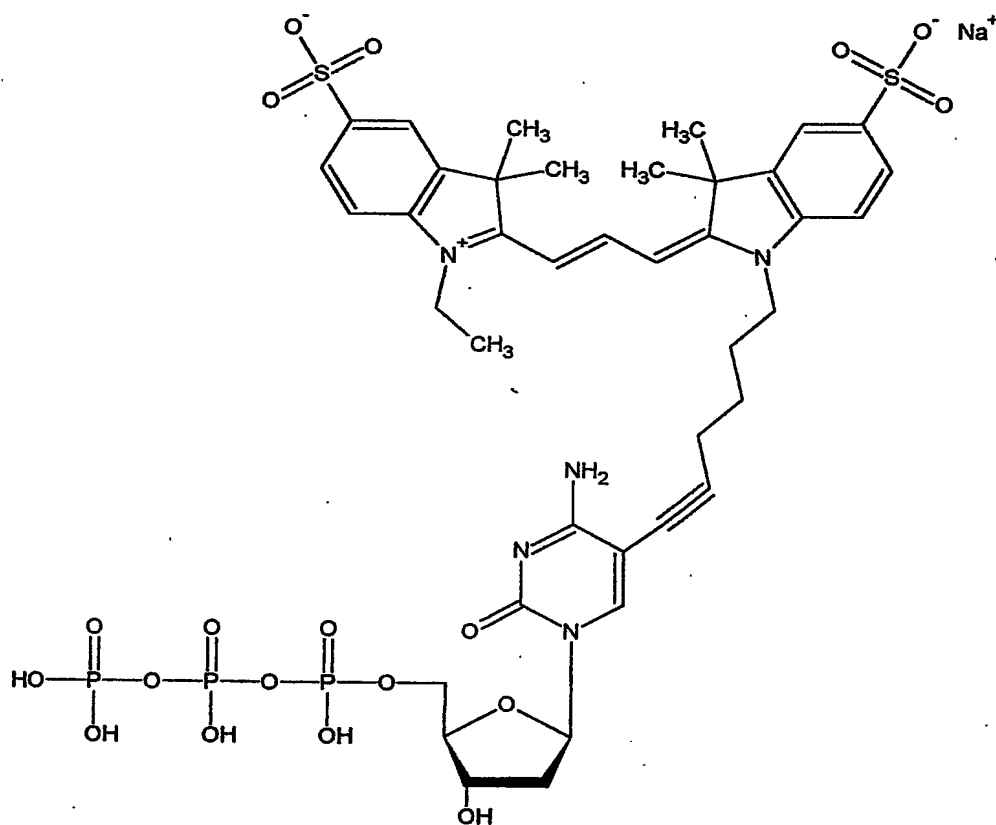


Composto 2

**Esempio 3. Sintesi di 5-(cianina IRIS 3 sulfo alchinil)-2'-deossicitidina trifosfato (Composto 3)**

Si collocano 59 mg (0,071 mmol) di Composto 2 nel pallone di reazione, sciogliendolo nel solvente  $(\text{CH}_3)_3\text{PO}_4$  e si fa riflussare argon per tutta la durata della reazione. Si raffredda la soluzione a  $-10^\circ\text{C}$  e si aggiungono 0.007 ml di  $\text{POCl}_3$ . Si fa agitare per trenta minuti a  $-10^\circ\text{C}$ , quindi si aggiungono altri 0.007 ml di  $\text{POCl}_3$  e si riporta lentamente a temperatura ambiente. Dopo 100 minuti dalla seconda aggiunta di  $\text{POCl}_3$  la monofosforilazione risulta completa. Si percola la miscela di reazione in una

soluzione di  $\text{Na}[\text{NH}(\text{C}_4\text{H}_7)_3]\text{P}_2\text{O}_7$  in  $\text{N,N}$ -dimetilformammide preraffreddata a  $-10^\circ\text{C}$ . Dopo 100 minuti la soluzione è addizionata a  $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$  (0.1 ml) sciolta in acqua (1.42 ml) e preraffreddata a  $0^\circ\text{C}$ . Si agita in ghiaccio per 15 minuti e si lascia tutta la notte a  $4^\circ\text{C}$ . Si purifica per MPLC a fase inversa.



Composto 3

**Esempio 4. Sintesi di 1-(4-carboxybutyl)-1'-es-5-inil-3,3',3'-tetrametil-5,5'-disulfonato indodicarbocianina sale di sodio (Composto 4)**

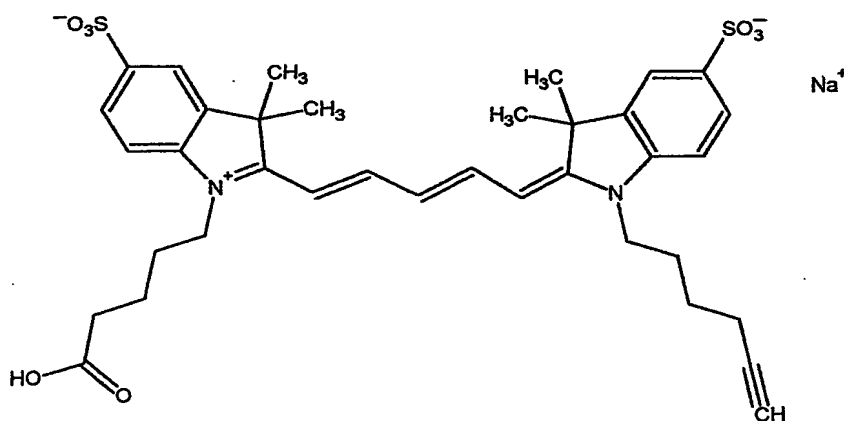
In un pallone da 250 mL si collocano 2,69 g (8,43 mmol) di  $\text{N}$ -es-5-inil-2,3,3-trimetilindoleninio-5-solfonato, 4,84 g (16,98 mmol) di

malonaldeide            dianilide            (*N*-[(1*E*,2*E*,4*E*)-5-anilinopenta-2,4-dienilidene]benzenaminio cloruro), 6,0 mL di cloruro di acetile e 60,0 mL di anidride acetica. La miscela è riscaldata a 120 °C per 90 minuti. La soluzione arancione è raffreddata fino a temperatura ambiente e addizionata goccia a goccia a 300 mL di etere dietilico agitato vigorosamente. Il prodotto (emicianina) è raccolto su un filtro di vetro sinterizzato, lavato con etere dietilico ed essiccato sotto vuoto in un essiccatore. Il prodotto desiderato ha un massimo di assorbanza in metanolo a 378 nm. La resa è del 97 %.

5,96 g (12,14 mmol) dell'emicianina sintetizzata nel passaggio precedente è collocata in in pallone da 250 mL insieme a 4,41 g (12,14 mmol) di *N*-(4-carbossibutil)-2,3,3-trimetilindoleninio-5-solfonato di sodio, 10,80 mL di trietilammina e 109 mL di anidride acetica, e riscaldata a 135 °C per 2 h. La soluzione blu è raffreddata fino a temperatura ambiente e addizionata goccia a goccia a 800 mL di etere dietilico agitato vigorosamente. Il prodotto desiderato è raccolto su un filtro di vetro sinterizzato, lavato con etere dietilico ed essiccato sotto vuoto in un essiccatore. Il prodotto è quindi purificato per cromatografia flash utilizzando un gradiente di una miscela diclorometano/metanolo da 90/10 a 70/30. La resa è del 42 %. Il prodotto ha il massimo di assorbanza in etanolo a 645 nm e il massimo di emissione a 665 nm.



*Handwritten signature or mark.*



Composto 4

**Esempio 5. Sintesi di 1-(4-carbossibutil)-1'-{6-[N,N'-Difluoroboril-1,9-dimetil-5-(4-iodofenil)-dipirril]-es-5-inil}-3,3,3',3'-tetrametil-5,5'-disulfonato indodicarbocianina sale di sodio (IRIS 5 alchinil-dimethylBDPY) (Composto 5)**

Il Composto 4 e N,N'-Difluoroboril-1,9-dimetil-5-(4-iodofenil)-dipirrina sono posti a reagire analogamente alla procedura descritta nell'esempio 2.

Si collocano 18,6 mg (0,044 mmol) di N,N'-Difluoroboril-1,9-dimetil-5-(4-iodofenil)-dipirrina e 1,7 mg (0,0088 mmol) di CuI in un vial munito di ancorotta magnetica; si aggiungono 90,5 mg (0,131 mmol) di Composto 4 sciolto nella minima quantità di N,N-dimetilformamide anidra. Si fa riflussare argon per quindici minuti. Si aggiungono 0,012 mL (0,0088 mmol) di  $N(C_2H_5)_3$  e 3,0 mg (0,0044 mmol) di  $(C_6H_5)_2PdCl_2$  e si fa riflussare argon per altri quindici minuti. Si lascia reagire sotto agitazione a temperatura ambiente per otto ore. Passato il tempo si aggiungono ancora 1,7 mg (0,0088 mmol) di CuI, 0,012 mL di  $N(C_2H_5)_3$  e 3,0 mg (0,0044

mmol) di  $(C_6H_5)_2PdCl_2$  e si lascia reagire sempre nelle stesse condizioni per altre 16 ore. Si effettua una purificazione su colonna MPLC (eluenti:  $CH_3OH$ ,  $H_2O$ ). Si ottiene il composto di Formula 13. Il prodotto si presenta come un solido polverulento di colore blu.

**Esempio 6. Marcatura di DNA tramite reazione di incorporazione di 5-(cianina IRIS 3 sulfo alchilil)-2'-deossicitidina trifosfato mediante PCR**

I coniugati dei nucleotidi sono stati testati mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) onde valutarne l'efficienza come substrati per la polimerasi. Come DNA stampo si è utilizzato un plasmide derivato dal vettore commerciale pBluescript II SK (Statagene) al cui interno è stato clonato un frammento di cDNA derivato dal gene umano hGATA-3. Utilizzando come primers per l'amplificazione del DNA, due oligonucleotidi standard T7 (forward primer) e T3 (Reverse primer) si genera un frammento della lunghezza attesa di 1000 bp (paia di basi). La PCR è stata eseguita utilizzando diverse concentrazioni (da 0 a 50  $\mu M$ ) di nucleotide marcato con la cianina fluorescente contenente il braccio alchililico, come riassunto nella seguente tabella:

	Conc. stock	Conc. finale	C+	C-	10 $\mu M$	20 $\mu M$	30 $\mu M$	50 $\mu M$
DNA Stampo	1 ng/ $\mu l$	10 ng	10 $\mu l$	-	10 $\mu l$	10 $\mu l$	10 $\mu l$	10 $\mu l$
10x PCR buffer	10 x	1x	5 $\mu l$	5 $\mu l$	5 $\mu l$	5 $\mu l$	5 $\mu l$	5 $\mu l$
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	1.5 $\mu l$	1.5 $\mu l$	1.5 $\mu l$	1.5 $\mu l$	1.5 $\mu l$	1.5 $\mu l$

T7 Primer (Fw)	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
T3 primer (Rv)	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
d (ACT)P mix	3.3 mM	200 $\mu$ M	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
DCTP	0.5 mM	variabile	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	19 $\mu$ l	18 $\mu$ l	17 $\mu$ l	15 $\mu$ l
5-(cianina IRIS 3 alchinil)-2'- dCTP	0.5 mM	variabile	-	-	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	3 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Taq DNA Pol	2 U/ $\mu$ l	1U	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	-	Qb 50 $\mu$ l	5 $\mu$ l	15 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

La reazione di PCR è stata eseguita secondo il seguente protocollo strumentale, utilizzando un termociclatore iCycler (Biorad):

STEP 1 (1 ciclo)

94°C 4 min

STEP 2 (10 cicli)

Denaturazione 95°C 1 min

“Annealing” 60°C 1 min

Abbassa temperatura dopo il primo ciclo di 1.0°C ad ogni ciclo (metodo “touch-down”)

Estensione 72°C 1 min

STEP 3 (20 cicli)

Denaturazione 95°C 1 min

“Annealing” 50°C 1 min



*GF*

Estensione 72°C 1 min

STEP 4 (1 ciclo)

4°C infinito

Dopo la PCR, 1/10 di ogni reazione è stato controllato su gel di agarosio 0.8%. La rimanente parte è stata purificata mediante kit QIAquick PCR purification (Qiagen) secondo le istruzioni fornite. Il DNA è stato poi diluito in 120 µl di acqua ed analizzato mediante spettrofotometro e fluorimetro riscontrando le tipiche bande di assorbimento ed emissione della cianina.

**Esempio 7. Coniugazione di IRIS 5 alchinil-dimethylBDPY con il peptide bioattivo della proteinchinasi**

Il peptide bioattivo inibitore della proteinchinasi (disponibile dalla Sigma-Aldrich) utilizzato in questo esempio ha sequenza: Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Ala Ser Gly Arg Thr Gly Arg Arg Asn Ala Ile His Asp con il gruppo -NH<sub>2</sub> terminale libero.

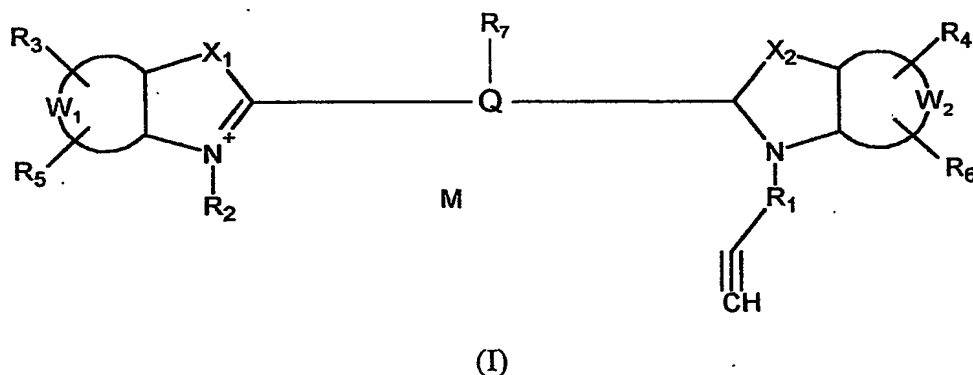
In un pallone ad un collo da 50 mL si caricano 29,55 mg di Composto 5 (IRIS 5 alchinil-dimethyl-BDPY) (0,03 mmol), 12,36 mg di Dicicloesilcarbodiimide, 6,9 mg di N-idrossisuccinimide e 3 mL di N,N-dimetilformamide anidra. Si lascia reagire a 70°C per 5 ore. Trascorso il tempo, si aggiunge alla miscela di reazione una soluzione del peptide bioattivo (133,34 mg in 2 mL di DMF) e si lascia reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Si ottiene il coniugato voluto che viene purificato mediante cromatografia liquida a media pressione (MPLC).





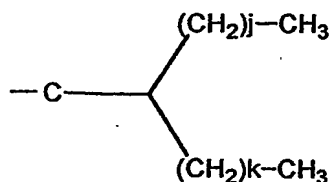
## RIVENDICAZIONI

1. Cianina modificata con braccio di legame alchinilico avente la seguente formula generale (I), inclusi i suoi tautomeri di valenza:



in cui

$R_1$  è una catena alchilica lineare, satura o insatura, avente da 1 a 30 atomi di carbonio, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un componente indipendentemente scelto fra un atomo di ossigeno o di zolfo, un gruppo  $-NH-$  o  $-CONH-$ , o un raggruppamento ciclico di atomi di carbonio a 4, 5 o 6 membri, aromatico o non aromatico, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un eteroatomo indipendentemente scelto fra ossigeno, zolfo, azoto e selenio;  $W_1$  e  $W_2$  sono indipendentemente scelti tra un anello benzenico e un anello naftalenico in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti da uno o più eteroatomi scelti fra ossigeno, zolfo, selenio e azoto, oppure uno tra  $W_1$  e  $W_2$  è assente, oppure entrambi sono assenti;  $X_1$  e  $X_2$  sono indipendentemente scelti nel gruppo che consiste di  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-Se-$ ,  $-N-$ ,  $-C(CH_3)_2$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-NH-$ , e



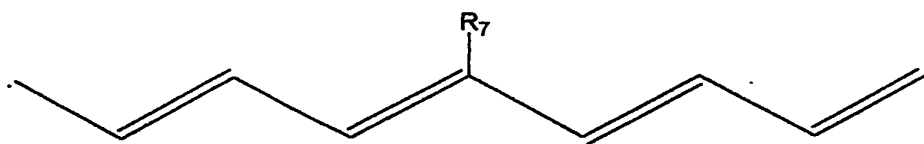
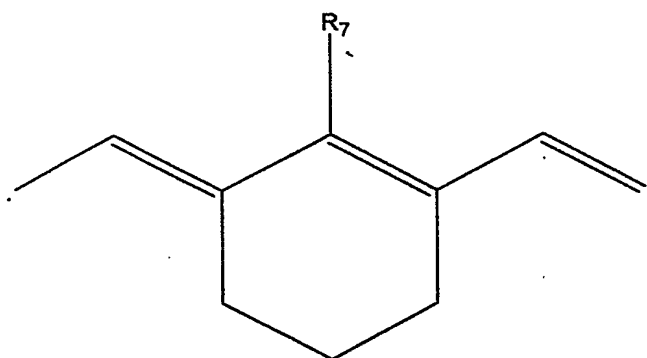
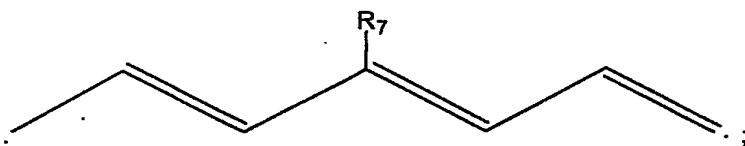
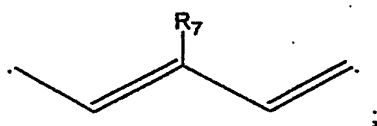
con  $j=1-20$  e  $k=1-20$ ;

$R_2, R_3, R_4, R_5$  ed  $R_6$  sono indipendentemente scelti fra idrogeno,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3^-$ , e  $-\text{R}_8\text{-Y}$  in cui  $R_8$  è una catena alchilica lineare, satura o insatura, avente da 1 a 30 atomi di carbonio, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un componente indipendentemente scelto fra un atomo di ossigeno o zolfo, un gruppo  $-\text{NH}-$  o  $-\text{CONH}$ , o un raggruppamento ciclico di atomi di carbonio a 4, 5 o 6 membri, aromatico o non aromatico, in cui uno o più atomi di carbonio sono eventualmente sostituiti ciascuno da un eteroatomo indipendentemente scelto fra ossigeno, zolfo, azoto o selenio, ed in cui  $Y$  è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, carbossile, carbonile, ammino, sulfidril, tiocianato, isotiocianato, isocianato, maleimide, ossidril, fosforamidito, glicidile, imidazolile, carbamoile, anidride, bromoacetamido, cloroacetamido, iodoacetamido, solfonil alogenuro, alogenuro acilico, alogenuro arilico, idrazide, estere succinimidilico, estere idrossisulfosuccinimidico, estere ftalimidico, estere naftalimidico, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina mono- o di- alogeno sostituita, diazina mono- o di- alogeno sostituita, aziridina, estere imidico, idrazina, azidonitrofenile, azide, 3-(2-piridil ditio)-propionamide, gliossale, aldeide, nitrofenil, dinitrofenil, trinitrofenil e  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ;

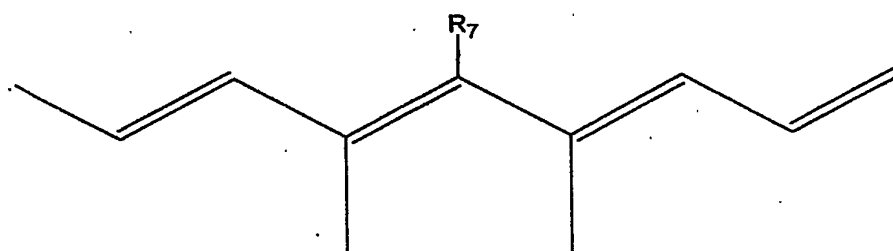
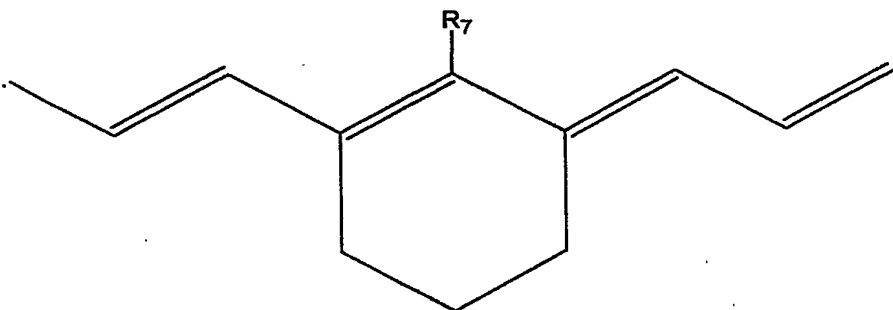
*ge*

M è un controione; e

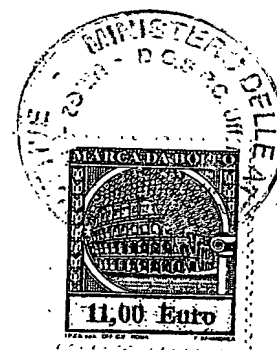
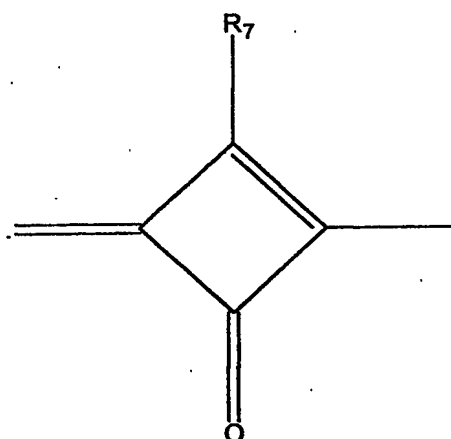
Q è una catena polimetinica scelta fra:



gc



oppure



in cui  $R_7$  è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, fluoro, cloro, bromo, iodio, fenossi, tiofenossi, anilino, cicloesilamino, piridina,  $-R_8-Y$ ,  $-O-R_8-Y$ ,  $-S-R_8-Y$ ,  $-NH-R_8-Y$ , in cui  $R_8$  e  $Y$  sono come definiti sopra, e arile eventualmente sostituito con uno o più sostituenti scelti indipendentemente nel gruppo che, consiste di  $-SO_3H$ , carbossile ( $-COOH$ ), ammino ( $-NH_2$ ),

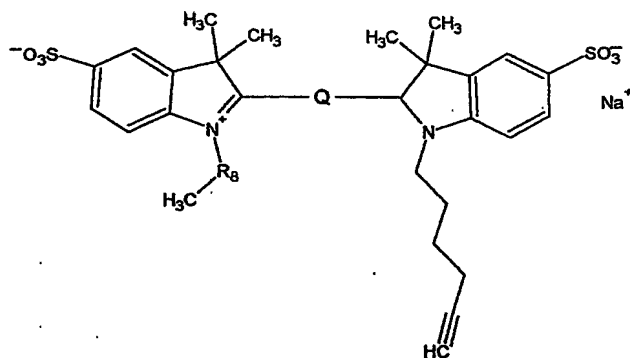
*ge*

carbonile (-CHO), tiocianato (-SCN), isotiocianato (-CNS), epossidi e -COZ dove Z rappresenta un gruppo uscente.

2. Cianina secondo la rivendicazione 1, in cui detto gruppo uscente è scelto dal gruppo che consiste di -Cl; -Br; -I; -OH; -OR<sub>11</sub>; -OCOR<sub>11</sub>, in cui R<sub>11</sub> è alchile avente da 1 a 4 atomi di carbonio, lineare o ramificato; -O-CO-Ar, in cui Ar è arile eventualmente sostituito; -O-CO-Het, in cui Het è scelto tra succinimide, sulfosuccinimide, ftalimide e naftalimide; -NR<sub>22</sub>R<sub>33</sub>, in cui R<sub>22</sub> e R<sub>33</sub> sono ciascuno indipendentemente alchile avente da 1 a 10 atomi di carbonio, lineare o ramificato.

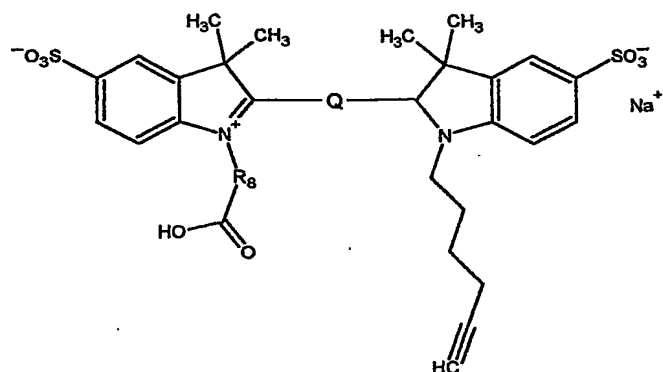
3. Cianina secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui uno tra R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> ed R<sub>6</sub> è -R<sub>8</sub>-Y, in cui Y è diverso da H e da -C≡CH.

4. Cianina secondo la rivendicazione 3, scelta dal gruppo che consiste di:

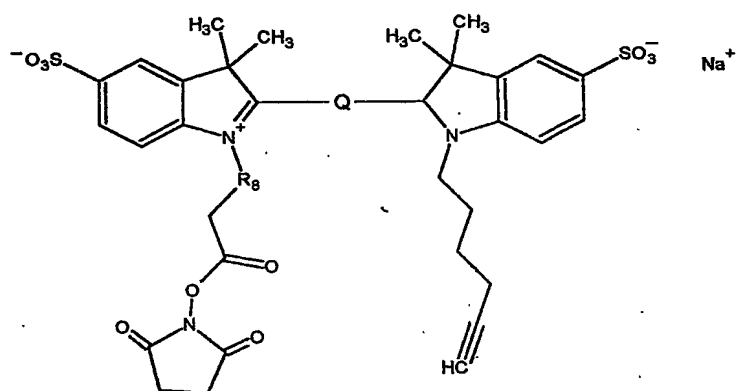


Formula (Ia)

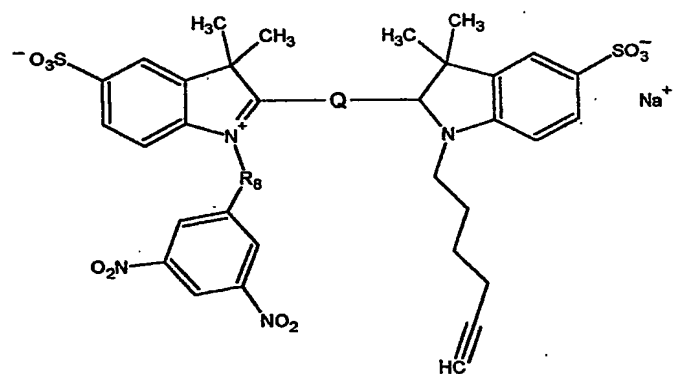
*Handwritten signature*



Formula (Ib)

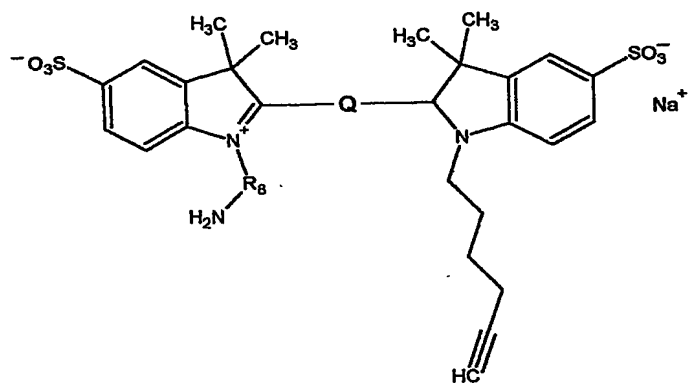


Formula (Ic)

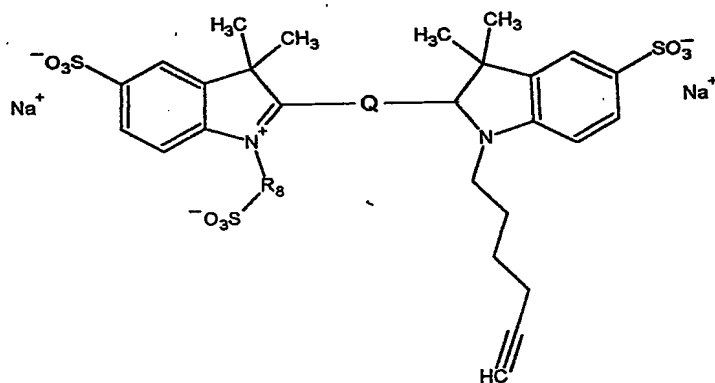


Formula (Id)

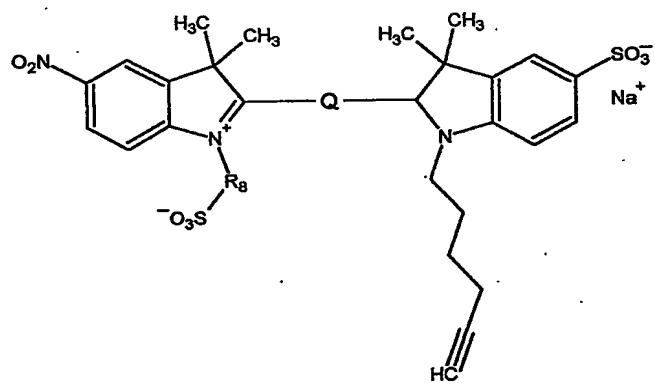
9C



Formula (Ie)

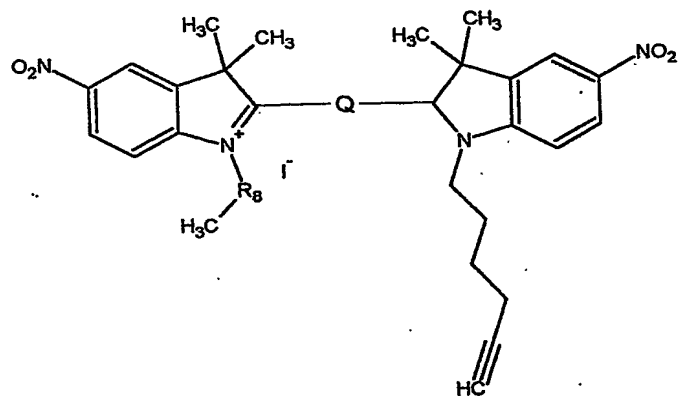


Formula (If)

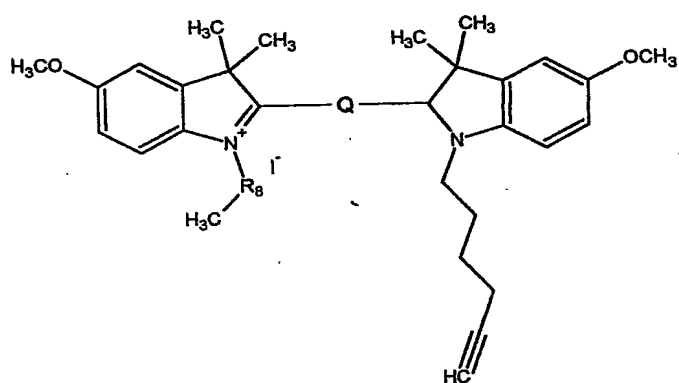


Formula (Ig)

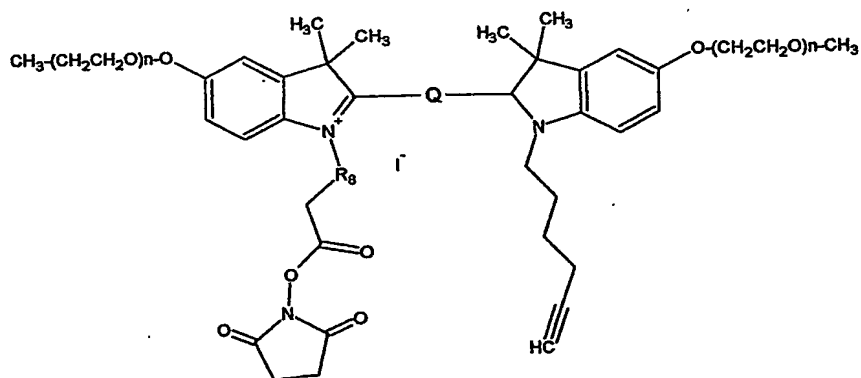
gc



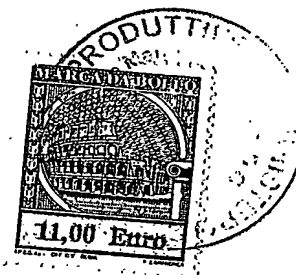
Formula (Ih)



Formula (Ii)

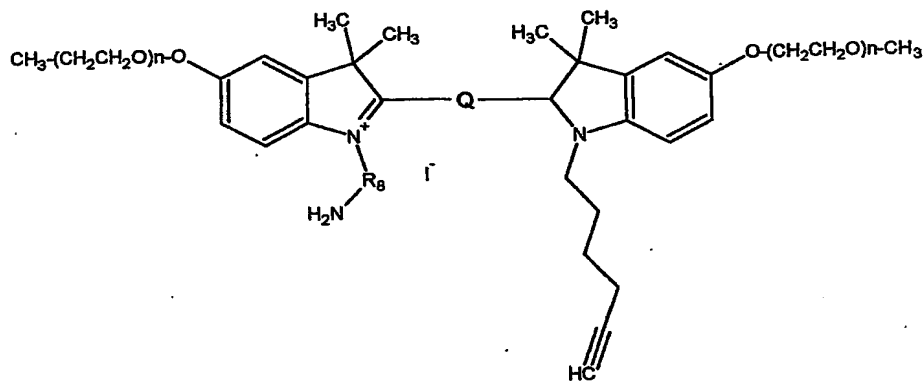


Formula (II)

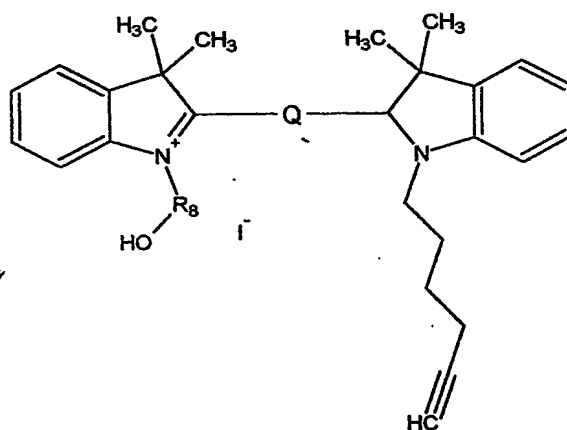


sc





Formula (Im)

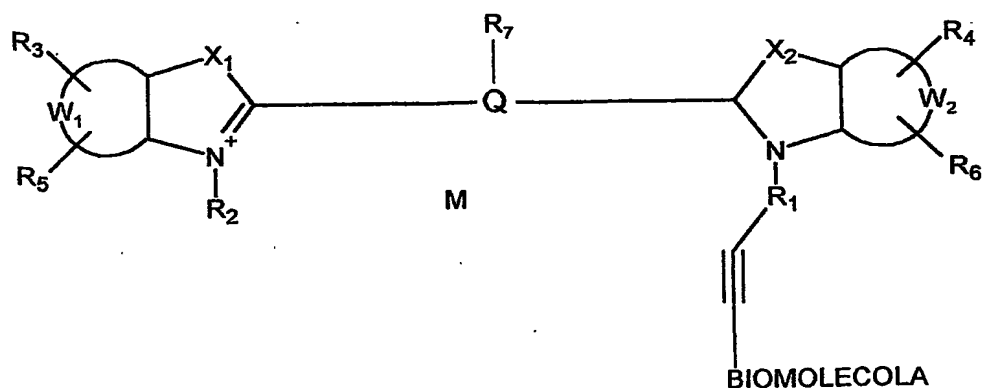


Formula (In),

in cui Q ed  $R_8$  sono come definiti nella rivendicazione 1 ed n è un numero intero tra 1 e 100.

5. Cianina secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, coniugata attraverso il braccio di legame  $-R_1-C\equiv CH$  con una biomolecola, detta cianina coniugata essendo rappresentata dalla formula generale (II), inclusi i suoi tautomeri di valenza:

*pe*

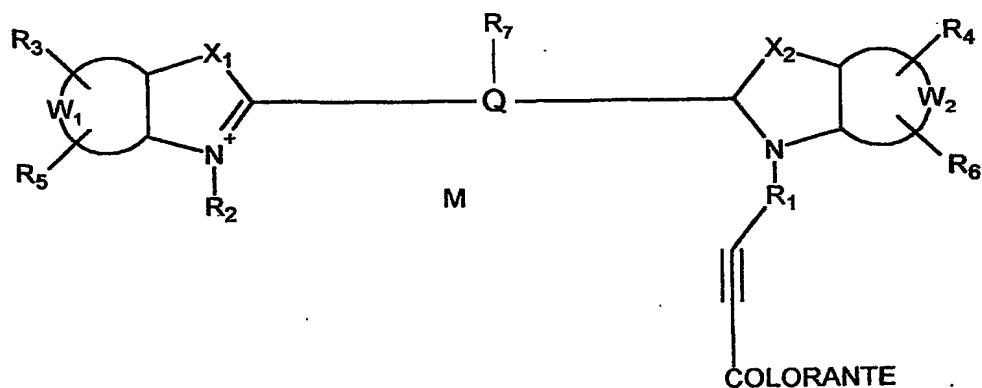


in cui  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $Q$  ed  $M$  sono come definiti nella rivendicazione 1.

6. Cianina secondo la rivendicazione 5, in cui detta biomolecola è scelta dal gruppo che consiste di nucleotidi, nucleosidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, peptidi e proteine.

7. Cianina secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, coniugata attraverso il braccio di legame  $-R_1-C\equiv CH$  con un secondo colorante fluorescente, detto secondo colorante fluorescente essendo in grado di emettere fluorescenza a lunghezze d'onda a cui la cianina è in grado di assorbire, oppure detto colorante fluorescente essendo in grado di assorbire a lunghezze d'onda a cui la cianina è in grado di emettere, detta cianina coniugata con un secondo colorante fluorescente essendo rappresentata dalla formula generale (III), inclusi i suoi tautomeri di valenza:

*ge*



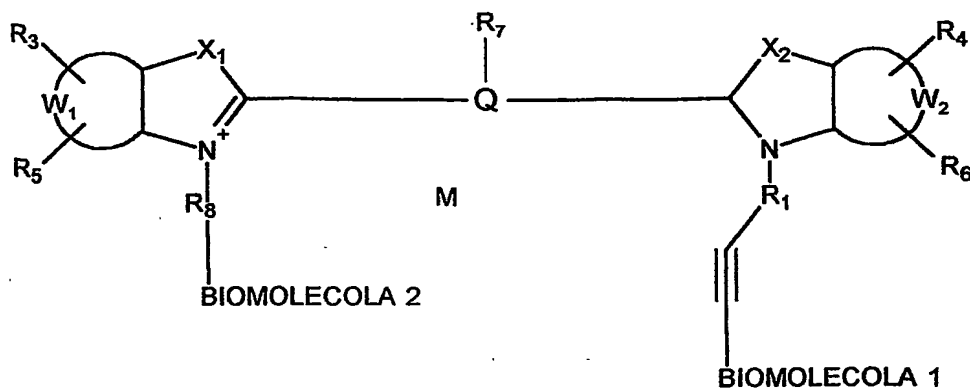
(III)

in cui  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $Q$  ed  $M$  sono come definiti nella rivendicazione 1.

8. Cianina coniugata secondo la rivendicazione 7, in cui detto secondo colorante fluorescente è la  $N,N'$ -difluoroboril-1,9-dimetil-5-(4-iodofenil)-dipirrina.

9. Cianina coniugata secondo la rivendicazione 7, in cui detto secondo colorante fluorescente è un complesso di un metallo di transizione con almeno un legante eterociclico azotato.

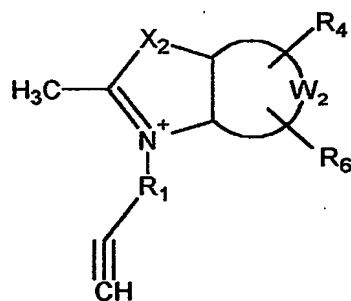
10. Cianina secondo la rivendicazione 3, coniugata attraverso il braccio di legame  $-R_1-C\equiv CH$  con una prima biomolecola scelta dal gruppo che consiste di nucleotidi, nucleosidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, proteine, peptidi, vitamine ed ormoni, e attraverso il braccio di legame  $-R_3-Y$  con una seconda biomolecola uguale o differente scelta dal gruppo che consiste di nucleotidi, nucleosidi, oligonucleotidi, acidi nucleici, proteine, peptidi, vitamine e ormoni, detta cianina coniugata con una prima e una seconda biomolecola essendo rappresentata dalla formula generale (IV):



(IV)

in cui  $R_1, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, W_1, W_2, X_1, X_2, Q$  ed  $M$  sono come definiti nella rivendicazione 1.

11. Intermedio per la preparazione di una cianina modificata con braccio di legame alchilico di formula (I) come definita nella rivendicazione 1, detto intermedio essendo rappresentato dalla formula generale (A):



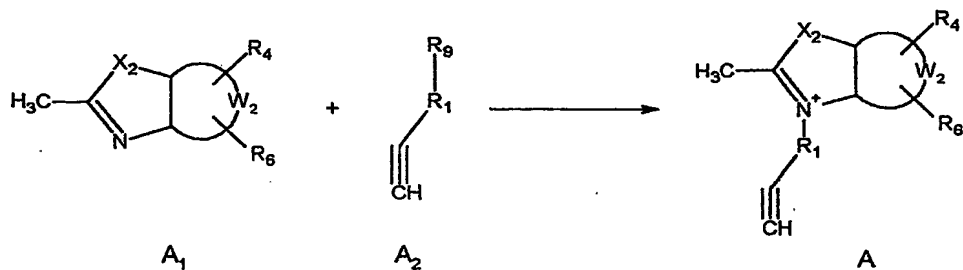
(A)

in cui  $R_1, R_4, R_6, X_2, W_2$  sono come definiti nella rivendicazione 1.

12. Procedimento per la preparazione di un intermedio di formula (A) come definito nella rivendicazione 11, comprendente la fase di far reagire un sistema eterociclico azotato di formula  $A_1$  con una molecola contenente



un triplo legame terminale di formula  $A_2$  per formare un sale di ammonio quaternario alchinilico di formula A:



in cui  $X_2$ ,  $R_1$ ,  $R_4$ ,  $R_6$  e  $W_2$  sono come definiti nella rivendicazione 1, e  $R_9$  è scelto nel gruppo che consiste di iodio, cloro, bromo, OH, solfato e tosilato.

13. Uso di una cianina secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4 come marcatore fluorescente di biomolecole o come quencher.

Data 12/08/2003

Firma G. Laputa